

Wiaslan Figueiredo Martins

**PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* SOB
CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, WIASLAN FIGUEIREDO MARTINS
PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* SOB
CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS / WIASLAN FIGUEIREDO MARTINS
Martins ; orientador, Gláucia Maria Falcão de ARAGÃO
Aragão - Florianópolis, SC, 2015.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

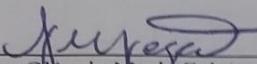
1. Engenharia de Alimentos. 2. bactérias ácido
lácticas. 3. *Weissella viridescens*. 4. deterioração. 5.
microbiologia preditiva. I. Aragão, Gláucia Maria Falcão
de ARAGÃO. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III.
Titulo.

“PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS”

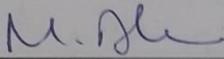
Por

Wiaslan Figueiredo Martins

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

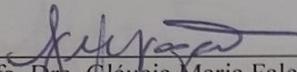


Prof. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora

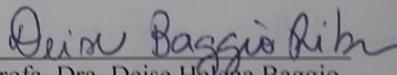


Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador

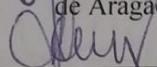
Banca Examinadora:



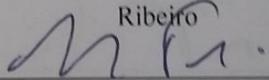
Prof. Dra. Gláucia Maria Falcão
de Aragão



Prof. Dra. Deise Helena Baggio
Ribeiro



Prof. Dr. João Borges Laurindo



Dr. Giustino Tribuzi

Florianópolis, 11 de março de 2015.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Creuziene e Francisco (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua bondade e força, ajudando a realizar este trabalho e superando os momentos difíceis.

Ao meu pai Francisco (*In memoriam*) que mesmo não estando hoje presente, foi quem me fez acreditar na realização dos meus sonhos. Amo-te pai onde estiver. E a minha mãe Creuziene, que em todos os momentos da minha vida foi minha amiga, irmã e conselheira me apoiando durante as dificuldades.

A todos meus familiares, em especial aos meus irmãos Claudinha, Gilson, Aécio e Nídia pelo apoio quando eu mais precisei. Agradeço a ajuda nas horas mais difíceis.

A minha orientadora Profa. Dr^a. Gláucia, pelos ensinamentos, amizade e pela confiança na realização desta pesquisa. Agradecer à dedicação, o incentivo, as boas conversas e os conhecimentos transmitidos.

Aos professores Dr. João, Dr^a. Deise, Dr. Giustino por terem aceitado contribuir com esta pesquisa, engrandecendo este trabalho.

A todos os colegas do ENGEBIO, pelo apoio, incentivo e experiências compartilhadas, em especial a Déia e o Jean, que foram os primeiros amigos a me receberem de braços abertos no laboratório. Tiverem paciência nos meus primeiros plaqueamentos, obrigado de coração.

Agradecer minha amiga Ana Paula (Ana BAL), por conceder os dados da bactéria que se tornou nossa “filha comportada”, rsrs. Obrigado por me ajudar muuuuuito quando precisei dos teus conselhos!

Este trabalho seria mais cansativo se não fosse minhas amigas Cami, Nathália, Natielle e Naomi, que me ajudaram nos plaqueamentos, foram muitas noites no laboratório, e mesmo com todo nosso cansaço estávamos sempre nos divertindo, obrigado por tornarem esta pesquisa mais prazerosa.

Um agradecimento especial ao meu amigo Dani, foi uma grande parceria firmada para a realização destes experimentos. Obrigado por sempre disponibilizar um pouco do seu tempo para tirar minhas

dúvidas das rotinas do Matlab, me aconselhar no tratamento dos meus dados, obrigado pela amizade. Você é um exemplo de vida.

As minhas amigas do grupo PHB: Kelin, Mélo,di, Kellen, Fran, foram muitas noites no laboratório juntos, obrigado pela torcida para que nossos experimentos dessem certos!!

Aos meus colegas do mestrado, Gabi, Camilinha, Fernanda, Clarissa, Fabi, Camila Guindani, Santiago e Felipe, pelas boas conversas, risadas, histórias contadas e nossos churrascos que sempre foram muito animados, “1ª bateria, 1ª bateria, vira vira vira...rsrs”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos os meus familiares e amigos, que contribuíram de alguma forma para mais uma etapa vencida.

Muito Obrigado!

Uma só coisa é necessário ter: um espírito livre
por natureza ou um espírito tornado leve pela
arte e pela ciência.

(Friedrich Nwietzsche, 1878)

RESUMO

A deterioração de alimentos devido à ação de microrganismos é um problema de grande importância que pode gerar grandes perdas econômicas para as indústrias. As bactérias ácido lácticas (BAL) estão entre os principais microrganismos deterioradores de alimentos, e dentre elas, a *Weissella viridescens* (anteriormente denominada *Lactobacillus viridescens*) é bastante conhecida por causar deterioração na superfície de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo e em diferentes condições de armazenamento, mesmo em condições de refrigeração. A microbiologia preditiva é considerada uma importante ferramenta para descrever o crescimento microbiano em diferentes condições ambientais. Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a capacidade preditiva de um modelo não isotérmico no crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo, em diferentes perfis de temperatura. Primeiramente o modelo primário de Baranyi e Roberts foi ajustado às curvas de crescimento, anteriormente obtidas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), de *W. viridescens* em meio de cultura sob seis diferentes temperaturas isotérmicas (4 a 30 °C). Foram avaliados quatro modelos secundários para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento, que foi melhor descrita pelo modelo da raiz quadrada para o parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$. O modelo secundário para o parâmetro $Y_{m\acute{a}x}$ foi considerado como a média dos valores obtidos experimentalmente, independente da temperatura, na faixa de temperatura estudada. Com base nos modelos selecionados, o modelo de Baranyi e Roberts (1994) foi utilizado para prever o crescimento de *W. viridescens* sob condições não isotérmicas. O modelo proposto foi validado com dados experimentais de *W. viridescens* em meio MRS, sob diferentes perfis de temperatura, envolvendo temperaturas acima da temperatura de refrigeração e simulando oscilações de temperatura em refrigeradores domésticos. Os resultados mostraram que o modelo preditivo estudado tem a possibilidade de ser utilizado para prever a vida útil de produtos cárneos cuja deterioração ocorra, principalmente, em consequência do crescimento de *W. viridescens*.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, *Weissella viridescens*, deterioração, variações de temperatura, microbiologia preditiva.

ABSTRACT

The food spoilage due to the action of microorganisms is a large problem that can cause economic losses to industries. The lactic acid bacteria (LAB) are one of the main spoilage microorganisms in foods, and among them *Weissella viridescens* (previously *Lactobacillus viridescens*) is well known to spoil meat surfaces and vacuum-packed meat products in different storage conditions, even under refrigerated conditions. The predictive microbiology is considered an important tool to describe the microbial behavior under different environmental conditions. Therefore, the aim of this study was evaluate the predictive ability of a non-isothermal model for growth *W. viridescens* in culture medium, under different temperature profiles. First, the primary model of Baranyi and Roberts was fitted at curve of the growth, previously obtained in Biochemical Engineering Laboratory, of *W. viridescens* in culture medium in six different isothermal temperatures (4 to 30 ° C). Were evaluated four secondary models to describe the influence of temperature on the growth parameters, which was best described by the model of the square root for μ_{max} parameter. The secondary model for the Y_{max} parameter was considered as the mean values obtained experimentally, independent of temperature, the temperature range studied. Based on the selected models, Baranyi and Roberts (1994) model was used to predict the growth of *W. viridescens* under non-isothermal conditions. The proposed model was validated with experimental data of *W. viridescens* growth in MRS medium under different temperature profiles involving temperatures above refrigeration temperature and temperature fluctuations in domestic refrigerators. The results showed that this predictive model has the possibility of being used to predict the shelf-life of meat products which deterioration occurs mainly as a result of *W. viridescens* growth.

Keywords: lactic acid bacteria, *Weissella viridescens*, deterioration, temperature, predictive microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crescimento típico sob condições ambientais constantes.....	33
Figura 2. urva de crescimento microbiano influenciado, por exemplo, por uma mudança de temperatura no momento da linha instantânea vertical: indicação da fase <i>lag</i> inicial e intermediária.....	35
Figura 3. Esquema ilustrativo do preparo e realização dos cultivos não isotérmicos de <i>W.viridescens</i> em MRS.....	42
Figura 4. (a) Material utilizado no experimento, em câmara de fluxo laminar com luz UV e (b) procedimento do plaqueamento por profundidade.....	43
Figura 5. Influência da temperatura sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de <i>W. viridescens</i> . A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados experimentais (a). Os resíduos decorrentes do ajuste do modelo são apresentados na Figura (b).....	48
Figura 6. Relação entre os valores do parâmetro de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) observados vs preditos pelo modelo secundário da raiz quadrada obtido para <i>W. viridescens</i>	49
Figura 7. Valores do parâmetro população máxima de crescimento atingida (Y_{max}) em função da temperatura (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C). A linha contínua representa a média.....	50
Figura 8. Crescimento de <i>W. viridescens</i> submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-1), preditas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado e $Y_{m\acute{a}x}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.	52
Figura 9. Crescimento de <i>W. viridescens</i> submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-2), preditas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado e geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.....	53
Figura 10. Crescimento de <i>W. viridescens</i> submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-3), preditas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado e $Y_{m\acute{a}x}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.	54
Figura 11. Crescimento de <i>W. viridescens</i> submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-4), preditas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado e $Y_{m\acute{a}x}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.	55
Figura 12. Crescimento de <i>W. viridescens</i> submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-5), preditas pelo modelo de Baranyi e	

Roberts, considerando-se $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado e $Y_{m\acute{a}x}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.	56
Figura 13. Relação entre os dados de crescimento observados vs preditos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts obtidos para <i>W. viridescens</i> nos perfis de temperatura: (a) PNI-1 (b) PNI-2 (c) PNI-3 (d) PNI-4 e (e) PNI-5.	60
Figura 14. Crescimento de <i>W. viridescens</i> submetido às condições não isotérmicas do perfil PNI-6 (prateleira superior), preditas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado e $Y_{m\acute{a}x}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.	62
Figura 15. Crescimento de <i>W. viridescens</i> submetido às condições não isotérmicas do perfil PNI-7 (prateleira inferior), preditas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado e $Y_{m\acute{a}x}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.	62
Figura 16. Relação entre os dados de crescimento observados vs preditos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts obtidos para <i>W. viridescens</i> nos perfis de temperatura: (a) PNI-6 e (b) PNI-7. .	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações gerais sobre a acessibilidade, a data de criação, público alvo e da abordagem da modelagem utilizada em cada <i>software</i>	37
Tabela 2. Intervalos de tempo (horas) para cada temperatura dos perfis não isotérmicos.....	41
Tabela 3. Modelos secundários avaliados para descrever a influência da temperatura no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento de <i>W. viridescens</i>	44
Tabela 4. Índices estatísticos para validação do modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994).....	46
Tabela 5. Modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre o parâmetro velocidade específica máxima de crescimento de <i>W. viridescens</i>	47
Tabela 6. Valores do parâmetro $Y_{máx}$ ponderado estimados para os perfis não isotérmicos estudados para prever o crescimento de <i>W. viridescens</i>	51
Tabela 7. R_{aj}^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão da predição do crescimento de <i>Weissella viridescens</i> pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) nos cinco perfis de temperatura.....	59
Tabela 8. R_{aj}^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão da predição do crescimento de <i>Weissella viridescens</i> pelo modelo de Baranyi e Roberts na prateleira superior e inferior do refrigerador doméstico..	63

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	25
1.1 OBJETIVOS.....	26
1.1.1 Objetivo Geral.....	26
1.1.2 Objetivos Específicos.....	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1 BACTÉRAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	28
2.1.1 <i>Weissella viridescens</i>	29
2.2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO.....	31
2.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	31
2.4 MODELOS PREDITIVOS.....	32
2.4.1 Modelos primários de crescimento.....	32
2.4.2 A fase de adaptação intermediária (<i>lag intermediária</i>).....	34
2.4.3 Modelos secundários.....	36
2.4.4 Modelos terciários.....	37
2.4.5 Modelos não isotérmicos.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 MICRORGANISMO.....	40
3.2 PREPARAÇÃO DO PRÉ-CULTIVO.....	40
3.3 PREPARO E CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS DE CULTIVO..	40
3.4 OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	42
3.5 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....	43
3.5.1 Modelos secundários.....	43
3.6 PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>W. viridescens</i>	44
3.7 ANÁLISES NUMÉRICAS.....	45
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. ESTABELECIMENTO DOS MODELOS SECUNDÁRIOS.....	47

4.2. CRESCIMENTO DE <i>Weissella viridescens</i> SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS.....	52
4.3 PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>W. viridescens</i> EM REFRIGERADORES DOMÉSTICOS.....	61
5.CONCLUSÕES.....	65
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

A deterioração de alimentos devido à ação de microrganismos é um problema de grande importância que pode gerar grandes perdas econômicas para as indústrias, tornando-se fundamental a previsão da vida útil relacionado ao crescimento microbiano (PEXARA et al., 2002).

Quando se trata da verificação da qualidade dos alimentos, a avaliação microbiológica é de extrema relevância, pois fornece informações quanto às condições de processamento, armazenamento, distribuição, vida útil e risco à saúde da população (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

A fim de prolongar a vida útil de produtos alimentícios, pela minimização da deterioração microbiana e química, os refrigeradores devem manter uma temperatura entre 0 e 5 °C. Se as temperaturas subirem acima de 5 °C, os alimentos são susceptíveis à deterioração mais rápida, devido ao crescimento de microrganismos (WRAP, 2013). Vários estudos têm mostrado que a temperatura à qual um refrigerador doméstico opera é crítica para o armazenamento seguro de alimentos refrigerados (GHEBREHEWET e STEVENSON; BAKALIS et al., 2003; TAOUKIS et al., 2005 e LAGUERRE et al., 2002)

A carne e os produtos cárneos são altamente perecíveis, com vida útil estritamente dependente do número e do tipo de microrganismo inicialmente presente e do seu crescimento nas condições de armazenamento, particularmente pH, temperatura e atmosfera gasosa (RUSSO et al., 2006).

Dentre os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos estão as bactérias ácido lácticas (BAL) que constituem um grupo de bactérias Gram-positivas (AXELSSON 2004), anaeróbias facultativas, sem motilidade, que podem ser cocos ou bacilos não esporulados, que obtêm energia pela fermentação de carboidratos, produzindo ácido láctico como principal produto da fermentação (GEITENES et al., 2013 e MASSAGUER, 2006). Algumas espécies como *Weissella viridescens* (anteriormente *Lactobacillus viridescens*) podem produzir peróxido que reagem com os pigmentos da carne, causando esverdeamento da mesma. Vários pesquisadores têm descrito que este microrganismo foi responsável por esverdeamento em salsichas e presunto cozido fatiado (NIVEN ET AL., 1949; NIVEN, 1952; LORINCZ E INCZE, 1961 e SHARPE, 1962).

Para se determinar o grau de deterioração de um alimento, os métodos microbiológicos tradicionais são limitados pelo longo tempo requerido para se obterem resultados (MCMEEKIN; ROSS, 1996). Uma

alternativa a tais métodos é a aplicação da microbiologia preditiva, que envolve o desenvolvimento de modelos matemáticos a partir de conhecimentos sobre o comportamento de microrganismos (McMEEKIN et al., 2002).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta que permite descrever o comportamento das respostas microbianas às condições ambientais e permite a avaliação objetiva do efeito das operações de processamento, distribuição e armazenagem sobre a segurança microbiológica e qualidade de alimentos (McMEEKIN et al., 2002). Entretanto, nestas operações, a temperatura do alimento não se mantém constante, tornando-se necessário o uso de modelos capazes de prever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas. Assim, o desenvolvimento de modelos que considerem as variações de temperatura (condições não isotérmicas) apresenta-se de grande valia na previsão de vida útil sob condições reais (KOUTSOUMANIS et al., 2006; CAYRÉ et al., 2007).

Com base nestas informações, a utilização da modelagem do crescimento de *W. viridescens* em condições não isotérmicas visa simular o comportamento desta bactéria em condições de armazenamento em refrigerador doméstico e temperaturas acima da refrigeração, levando em conta as formas de oscilação de temperatura.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade preditiva de um modelo não isotérmico no crescimento de *Weissella viridescens* em meio de cultivo, submetidos a diferentes perfis de temperatura.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

(1) Estabelecer modelos secundários que descrevam a influência da variação da temperatura sobre os parâmetros $\mu_{m\acute{a}x}$ e $Y_{m\acute{a}x}$ de crescimento de *W. viridescens* a partir de dados obtidos no grupo de pesquisa;

(2) Estabelecer o modelo preditivo de crescimento de *W. viridescens* em condições não isotérmicas, a partir do modelo primário e secundário selecionados;

(3) Fazer o levantamento da distribuição e oscilação de temperatura dentro de refrigeradores domésticos e prever o seu impacto sobre o crescimento de *W. viridescens*;

(4) Validar o modelo estabelecido através dos dados experimentais obtidos do crescimento de *W. viridescens*, em ampla faixa de temperatura (4 a 25 °C) e temperaturas de refrigeradores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACTÉRAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) têm recebido atenção considerável por controlar perigos microbiológicos e desenvolver novas ferramentas para biopreservação (SCANNELL et al., 2000 e LÉONARD et al., 2014). Vários estudos têm mostrado que as BAL podem reduzir o crescimento de *L. monocytogenes* em carne e frutos do mar (BUDDE et al., 2003; JACOBSEN et al., 2003; e TAHIRI et al., 2009) e inibem outros patógenos de origem alimentar (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurim*, *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus*) (TRIAS et al., 2008).

No entanto, as BAL também são um grupo microbiano associado com a deterioração de produtos cárneos, processados, curados e embalados a vácuo ou atmosfera modificada (AM) e armazenados a temperaturas de refrigeração (BORCH et al., 1996; KORKEALA e BJÖRKROTH, 1997 e SAMELIS et al., 2000a). Essas condições de armazenamento facilitam o crescimento das BAL devido, principalmente, à microaerofilia e à capacidade de crescerem a temperaturas de refrigeração. Vários estudos têm mostrado que as BAL deteriorantes de produtos cárneos embalados em AM consiste de *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostocs mesenteroides* e, em alguns casos, *Carnobacterium* spp., e *Weissella* spp. (SAMELIS et al., 2000a; TAKAHASHI et al., 2004; KOORT et al., 2005; VERMEIREN et al., 2005; VASILOPOULOS et al., 2008 e AUDENAERT, et al., 2010).

As BAL deteriorantes podem causar efeitos indesejados, tais como sabores estranhos, descoloração, produção de gás, diminuição do pH e produção de muco, resultando em degradação prematura e redução na vida útil do produto final (BORCH et al., 1996; DAINTY e MACKEY, 1992; EGAN et al., 1998; KORKEALA e BJÖRKROTH, 1997; SAMELIS et al., 1998; SAMELIS et al., 2000a; SAMELIS et al., 2000b e AUDENAERT, et al., 2010). A velocidade com que esses efeitos indesejados ocorrem é dependente de uma combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como a composição do produto, o método de embalagem e, principalmente, a temperatura de armazenamento (BORCH et al., 1996).

Um problema bem conhecido pela indústria de carne é o esverdeamento de produtos cárneos, e uma das causas é o microrganismo *Weissella viridescens* que tem sido estudada por diversos

pesquisadores (HAN et al., 2011; HU et al., 2009 e SANTOS et al., 2005).

2.1.1 *Weissella viridescens*

Entre as bactérias ácido lácticas (BAL), o gênero *Weissella* foi primeiramente descrito por Collins et al. (1993) que, com base nas sequências de rRNA 16S, reclassificou as espécies *Leuconostoc paramesenteroides* e espécies relacionadas, tais como *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, e *Lactobacillus viridescens* para o novo gênero *Weissella*. As espécies deste gênero são não formadoras de esporos, gram-positivas, catalase-negativo, heterofermentativas obrigatórias, bactéria anaeróbia facultativa. Podem produzir D ou DL isômeros de ácido láctico como produtos finais da fermentação os, com a capacidade de fermentar a arginina variando de acordo com as espécies e com uma temperatura de crescimento que varia entre 15 e 45 °C. A sua morfologia varia de células esféricas ou lenticulares para hastes irregulares (BJÖRKROTH E HOLZAPFEL, 2006;. BJÖRKROTH ET AL, 2009; CHELO ET AL., 2010).

Dentro do gênero *Weissella* spp, um total de 19 isolados a partir de espécies diferentes ambientes, tais como animais, amostras clínicas de origem humana e animal, insetos, do solo e silagem fermentado; produtos alimentares, tais como legumes frescos, mel, arroz, açúcar, cacau, leite, carne, peixe, animais fermentados e produtos vegetais e produtos de carne estragado, foram identificados até esta data (BJÖRKROTH ET AL, 2002;. CHOI ET AL., 2002 ; DE BRUYNE ET AL, 2010;. DOULGERAKI ET AL, 2012;. ENNAHAR ET AL, 2003;. ERCOLINI ET AL, 2013;. GONZÁLEZ-QUIJANO ET AL, 2014;. HAN ET AL, 2014;. HOLZAPFEL E KANDLER, 1969; MAGNUSSON ET AL., 2002; OH ET AL, 2013.; SAMELIS ET AL, 2000B.; TAJABADI ET AL, 2012.; TANASUPAWAT ET AL., 2007; THAPA ET AL., 2006; TOHNO ET AL, 2013.; VELA ET AL, 2011.; WANG E NISHINO, 2008).

Numerosos estudos têm associado o *Weissella* com os processos de deterioração em produtos à base de carne, tais como o aparecimento de manchas verdes na sua superfície. Este fato é devido à sua capacidade de produzir H₂O₂, que reage com o pigmento hemochromogen da carne para formar cholemyoglobin que esta dá origem a cor verde (COMI ET AL, 2007;. JAY, 2000; NIVEN E

EVANS, 1957; PEIRSON ET AL. , 2003;. SCHILLINGER ET AL, 2006). Em adição a estas alterações na cor da carne, *W. viridescens*, juntamente com outras BAL, está também relacionada com os processos de deterioração em numerosos produtos à base de carne, tais como o presença de limo, odores desagradáveis e sabores, perda de vácuo, inchaço dos pacotes, descoloração e uma diminuição no pH (BJÖRKROTH E HOLZAPFEL, DE 2006; COMI E IACUMIN, 2012;. SAMELIS ET AL, 1994, 2000A, B).

O *Weissella viridescens* é um microrganismo conhecido por causar deterioração na superfície de carnes curadas, carne picada, hambúrguer, salsicha, entre outros (FARAG e KORASHY, 2006), o seu crescimento em produtos cárneos embalados a vácuo e em diferentes condições é fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento, mesmo em condições de refrigeração (KOUTSOUMANIS et. al, 2006; CAYRÉ et al., 2007).

Samelis et al., (2000a) relataram que *W. viridescens* foi encontrado em lombo suíno defumado embalado a vácuo, bacon, mortadela, bem como em salsichas embaladas a vácuo sob refrigeração. Em outro estudo, Samelis et al., (2000b), relataram que *W. viridescens* foi a principal espécie da microflora inicial de filés de peito de peru cozido embalado a vácuo.

As cepas de BAL resistentes ao calor podem causar a deterioração de produtos cárneos, e uma das espécies deste grupo de bactérias que foi provado ser capaz de sobreviver a tratamento térmico e induzir alterações sensoriais é o *W. viridescens* (COMI e IACUMIN, 2012; SAMELIS et al., 2000a). Kamenik et al., (2015), avaliaram a resistência térmica de quatro cepas de *W. viridescens* isoladas de salsicha defumada a quente, e concluíram que todas as cepas foram capazes de sobreviver à temperatura de 50 °C e nenhuma das cepas foi capaz de sobreviver a 70 °C, mesmo a 5 minutos de tratamento. Segundo Borch et al., (1996) e Milbourne, (1983), a resistência térmica relativamente elevada resulta das boas capacidades adaptativas de *W. viridescens* para sobreviver ao tratamento térmico.

Diante da importância do *W. viridescens* para indústria de carnes e produtos cárneos e a escassez de trabalhos envolvendo a modelagem matemática de seu crescimento, esta BAL foi selecionada para este estudo.

2.2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO

A temperatura é um dos fatores extrínsecos mais importantes para o controle de crescimento de microrganismos, pois pode variar durante a cadeia de produção e distribuição de alimentos perecíveis, sendo que a exposição a diferentes temperaturas pode comprometer a qualidade do produto (FU; LABUZA, 1992; VAN IMPE et al., 1992 e TREMARIN, 2013). Assim, o efeito da temperatura sobre o crescimento microbiano tem sido estudado por diversos pesquisadores (RATKOWSKY et al., 1982; ZWIETERING et al., 1991; McMKEEKIN et al., 1992; BUCHANAN, 1993b; ALMONACID-MERINO; TORRES, 1993, entre outros).

Para garantir segurança e qualidade dos alimentos, a temperatura precisa ser cuidadosa e continuamente monitorada e controlada em cada etapa da cadeia de abastecimento (MONTANARI, 2008). No entanto, temperaturas de refrigeração não são sempre constantes durante o manuseio de alimentos. Assim, os efeitos da temperatura sobre o crescimento microbiano têm sido amplamente estudados através de modelos matemáticos que consideram a variação de temperatura (MCMEEKIN e OLLEY, 1986; BUCHANAN, 1986; FU et al., 1991; McMEEKIN et al., 1992; BUCHANAN, 1992; ALMONACID-MERINO e TORRES, 1993 e LI e TORRES, 1993).

Ferreira (2004) avaliou o efeito da temperatura de estocagem de presunto fatiado sobre o crescimento de bactérias ácido lácticas e os resultados evidenciaram a importância da temperatura na vida útil dos alimentos, já que as BAL atingiram a fase estacionária em 51, 18 e 14 dias às temperaturas de 5, 8 e 15 °C, respectivamente.

A razão para a inibição do crescimento microbiano é que as reações metabólicas dos microrganismos são catalisadas por enzimas e a taxa de reação catalisada enzimaticamente é dependente da temperatura. Desta forma, com a redução da temperatura, ocorre uma redução na taxa de reação (JAY, 2005).

2.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Microbiologia preditiva é uma área de pesquisa aplicada em ciência dos alimentos em que se aplicam modelos matemáticos para descrever a dinâmica (crescimento e destruição) das populações de microrganismos submetidos às complexas alterações físicas, químicas e

biológicas no meio ambiente durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos (BUCHANAN, 1993a; McMEEKIN et al., 1993 e HUANG, 2014). A microbiologia preditiva tornou-se uma ferramenta útil na previsão microbiana de vida útil, controle de qualidade e avaliações de risco (HUANG, 2014).

2.4 MODELOS PREDITIVOS

Modelos em microbiologia preditiva podem ser usados para avaliar o potencial de crescimento de microrganismos em alimentos. O objetivo de um modelo é de prever quando, e sob que condições, o número de microrganismos pode crescer a um nível que possa ameaçar a saúde humana e/ou comprometer a vida útil de alimentos (SOBOLEVA et al., 2000).

Os modelos preditivos são classificados de acordo com o comportamento microbiano que descrevem. Assim, existem modelos de crescimento, de inativação e de limites de crescimento (WHITING, 1995; McMEEKIN e ROSS, 2002). Dependendo de seus objetivos específicos, os modelos podem ser classificados em modelos primários, secundários e terciários (WHITING e BUCHANAN, 1993). Modelos primários representam a dinâmica das populações microbianas através do tempo, sob condições ambientais e de cultivo constantes (invariantes no tempo) (McKELLAR e LU, 2004). Os modelos secundários descrevem a resposta dos parâmetros do modelo primário às mudanças ambientais (ROSS e DALGAARD, 2004) e os modelos terciários usam um ou mais modelos secundários e primários para gerar aplicações *softwares* de fácil utilização, que podem ser usados de forma sistemática por não-especialistas (BARANYI e TAMPLIN, 2004; BUCHANAN, 1991). Outra classificação proposta por Van Impe et al., (1992) são os modelos para fatores ambientais variáveis ou modelos dinâmicos, que descrevem o crescimento microbiano a partir das informações obtidas com os modelos primário e secundário(s).

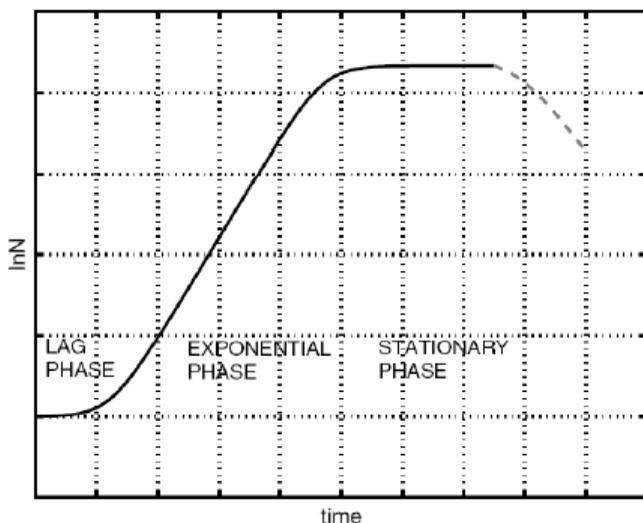
Vários autores (por exemplo, Ratkowsky et al., 1983, Zwietering et al., 1994 a,b, Rosso et al., 1995, Henk et al., 1997 e Ganzle et al., 1998) propuseram uma variedade de modelos que descrevem o crescimento microbiano em resposta a fatores ambientais como temperatura, pH, salinidade, etc. (SOBOLEVA, 2000).

2.4.1 Modelos primários de crescimento

Os modelos primários descrevem as alterações no número de microrganismos ou nas respostas microbianas com o tempo, num dado

ambiente específico. O modelo mais mecanicista e amplamente utilizado é o modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994), que se concentra em entender as causas da fase de latência e que introduz novos conceitos, como o estado fisiológico das células. Os parâmetros deste modelo são: a fase de latência (λ), a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), concentração inicial (Y_0) e final de células ($Y_{máx}$). Figura 1 mostra a curva de crescimento típico sob condições ambientais constantes.

Figura 1. Curva de crescimento típico sob condições ambientais constantes.



Fonte: Bernaerts et al. (2004).

O modelo de Baranyi é amplamente utilizado por algumas razões: (i) é fácil de usar por ter *softwares* disponíveis em que as equações já estão inseridas, (ii) é aplicável em condições ambientais dinâmicas, (iii) tem uma boa capacidade de ajuste, e (iv) a maior parte dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis (VAN IMPE et al., 2005 e LEBERT e LEBERT, 2006). Neste trabalho, foi estudado o modelo primário de Baranyi e Roberts para obtenção dos parâmetros de crescimento como descrito pelas equações abaixo:

$$\ln N = \ln Y_0 + \mu \cdot F(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m \cdot \mu \cdot t} - 1}{e^{m(Y_{\max} - Y_0)}} \right) \quad (2.1)$$

em que N é a concentração celular no tempo t , Y_0 é a concentração celular inicial, Y_{\max} é concentração microbiana máxima, m é o parâmetro de curvatura do modelo e $F(t)$ é dada pela equação 2.2:

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln \left(e^{(-\mu \cdot t)} + e^{(-h_0)} - e^{[(-\mu \cdot t) - h_0]} \right) \quad (2.2)$$

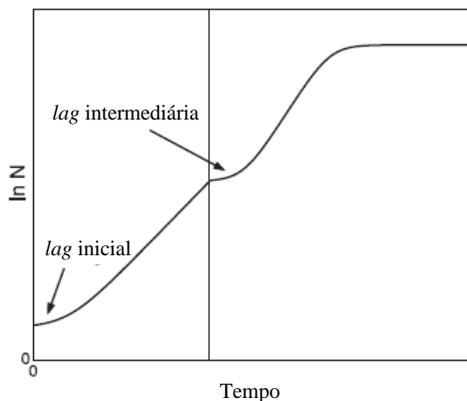
em que o parâmetro h_0 é considerado o estado fisiológico das células e é dado pela equação 2.3:

$$h_0 = \mu \cdot \lambda \quad (2.3)$$

2.4.2 A fase de adaptação intermediária (*lag intermediária*)

Um fenômeno inerente à cinética microbiana é a fase de adaptação, que é tipicamente observada como um atraso no crescimento microbiano decorrente de uma alteração no ambiente (SWINNEN et al., 2004). Normalmente, a fase de transição após a inoculação em um meio de cultivo em laboratório (ou, a contaminação de um produto alimentar), em condições ambientais constantes caracteriza-se como a fase *lag* inicial. No entanto, súbitas variações ambientais durante o crescimento pode também resultar em uma nova fase de adaptação microbiana, ou fase *lag* intermediária (Figura 2).

Figura 2. Curva de crescimento microbiano influenciado, por exemplo, por uma mudança de temperatura no momento da linha instantânea vertical: indicação da fase *lag* inicial e intermediária.



Fonte: SWINNEN et al., 2004

Alguns pesquisadores têm discutido os fatores que afetam a duração da fase *lag*. Dentre esses fatores estão: (i) mudanças das condições ambientais e (ii) o estado fisiológico das células (MCMEEKIN et al., 1993).

Segundo Baty e Delignette-Muller (2004), para estudar o fenômeno da fase de adaptação causado por mudanças no ambiente, é importante o uso de equações de modelos dinâmicos. No entanto, o modelo de Baranyi e Roberts (1994) selecionado para este estudo não é capaz de prever a fase *lag* intermediária, pois, a fase adaptação é descrita por uma função de ajuste $[\alpha(t)]$ que é uma função crescente com valores entre (aproximadamente) zero e um, uma vez que o valor $[\alpha(t)=1]$ é atingido, a população exibe crescimento exponencial na velocidade máxima (μ_{\max}). Este valor não pode diminuir para um valor inferior novamente, com as mudanças nas condições ambientais, o que explica o modelo dinâmico de Baranyi e Roberts (1994) não ter potencial para descrever uma fase *lag* adicional.

2.4.3 Modelos secundários

Os modelos secundários indicam a forma como os parâmetros dos modelos primários se alteram com mudanças nos fatores ambientais (WHITING, 1995). Um exemplo de um modelo utilizado é o modelo de Ratkowsky et al., (1982) que pode ser considerado como um modelo de protótipo adequado para descrever a dependência da velocidade específica máxima de crescimento microbiano em temperaturas abaixo do ideal (RATKOWSKY et al., 1982, SMITH, 1985, BUCHANAN E KLAWITTER, 1992). É de fácil utilização, se existir uma relação linear entre a raiz quadrada da velocidade de crescimento e a temperatura (LEBERT e LEBERT, 2006), como mostra a Equação 2.4:

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min}) \quad (2.4)$$

com b ($^{\circ}\text{C}^{-1} \text{ h}^{-1/2}$) um coeficiente de regressão e T_{\min} ($^{\circ}\text{C}$) a temperatura mínima teórica para o crescimento.

A equação foi mais tarde estendida para cobrir toda a gama de temperatura (RATKOWSKY et al., 1983). Isto resultou em um novo modelo de regressão não-linear empírico mostrado na Equação 2.5:

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min}) \{1 - \exp[c(T - T_{\max})]\} \quad (2.5)$$

em que c ($^{\circ}\text{C}^{-1}$) é um parâmetro empírico e os termos T_{\min} e T_{\max} podem ser utilizados para classificar os microrganismos de uma forma mais objetiva em psicrófilos, mesófilos ou termófilos (ROSS, 1993 e McDONALD e SUN, 1999).

Várias alterações e modificações têm sido feitas na Equação 2.5. McMeekin et al., (1987) acrescentou o parâmetro atividade de água (a_w) na Equação 2 e demonstrou que o modelo previu com precisão o efeito da temperatura e a_w na de crescimento de *Staphylococcus xylosus* em peixe seco salgado (McDONALD e SUN, 1999). A Equação modificada é apresentada abaixo:

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min}) \sqrt{(a_w - a_{w\min})} \quad (2.6)$$

em que α_{\min} é a atividade de água mínima teórica para o crescimento.

2.4.4 Modelos terciários

Os modelos terciários são ferramentas computacionais que integram os modelos primários e secundários em unidades de fácil utilização. O uso mais amplo de modelos na indústria de alimentos e de investigação depende da disponibilidade de *software* de fácil utilização, permitindo que diferentes usuários possam obter informações a partir de modelos preditivos de uma forma rápida e conveniente (PSOMAS et al., 2011).

Existem vários pacotes de *software* de modelagem microbiana, atualmente disponíveis. Algumas ferramentas têm sido demonstradas durante conferências internacionais, como por exemplo, *8th International Conference on Predictive Modelling in Food*, que aconteceu em Paris, França, em setembro de 2013 (TENENHAUS-AZIZA e ELLOUZE, 2013). Durante a conferência, uma "*Software Fair*" foi realizada para fornecer informações e demonstrações de *softwares* aplicados na microbiologia preditiva e avaliação de risco (TENENHAUS-AZIZA e ELLOUZE, 2015). As informações gerais sobre os *softwares* apresentados na "*Software Fair*" são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Informações gerais sobre a acessibilidade, a data de criação, público alvo e da abordagem da modelagem utilizada em cada *software*.

<i>Software</i>	Acessibilidade	Data de criação	Público alvo	Abordagem da modelagem
<i>Baseline</i>	Gratuito, acesso à internet	2012	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes	Determinística
<i>ComBase</i>	Gratuito, acesso à internet	2004	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística
Dairy Products Safety	Comercial, acesso à internet	2012	OSA	Probabilística

Predictor				
FDA-iRISK	Gratuito, acesso à internet	2012	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Probabilística
FILTRE X	Gratuito, disponível para <i>download</i>	2013	Pesquisadores, Professores, Estudantes	Probabilística
FISHMAP	Gratuito, disponível para <i>download</i>	2011	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	Gratuito, disponível para <i>download</i>	1999	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística
GInaFiT	Gratuito, disponível para <i>download</i>	2003	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística
GroPIN	Gratuito, disponível para <i>download</i>	2013	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística e probabilística
Listeria Meat Model	Comercial, disponível para <i>download</i>	2012	OSA, Governo	Determinística
MicroHibro	Gratuito, acesso à internet	2011	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Probabilística
MRV, Microbial Response s Viewer	Gratuito, acesso à internet	2008	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística

NIZO Premia	Comercial, acesso à internet	1995	OSA	Determinística
PMM-Lab	Gratuito, acesso à internet	2012	Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística
Prediction of Microbial Safety in Meat Products	Gratuito, acesso à internet	2006	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística
SymPrevius	Comercial, acesso à internet	2003	OSA, Pesquisadores, Professores, Estudantes, Governo	Determinística e Probabilística

OSA: Operadores do Setor de Alimentos.

Fonte: Tenenhaus-aziza e Ellouze, 2015.

2.4.5 Modelos não isotérmicos

A utilização de modelos preditivos pode auxiliar na determinação da vida útil de produtos submetidos a flutuações de temperatura (NAKASHIMA et al., 2000). Como a capacidade descritiva dos modelos primários pode ser garantida apenas para condições ambientais constantes, é necessário o uso de outras abordagens para prever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas (LONGHI, 2012), como por exemplo, utilizar a forma diferencial do modelo primário em conjunto com um modelo secundário (DALCANTON, 2010; CORRADINI e PELEG, 2005).

Koutsoumanis e Taoukis (2005) utilizaram modelos dinâmicos para prever a deterioração por *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* e bactérias ácido lácticas em carne moída bovina e suína, sob variação de temperatura e de pH. O modelo de Baranyi e Roberts foi utilizado para a estimativa dos parâmetros de crescimento e o modelo modificado de Arrhenius para modelar o efeito do pH e das temperaturas de armazenamento sobre os parâmetros cinéticos.

Dentre os vários modelos descritos na literatura, um dos mais utilizados é o modelo de Baranyi e Roberts (1994), na forma diferencial,

utilizado para prever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas (seção 3.6.).

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

Foi avaliado o crescimento da bactéria ácido láctica *Weissella viridescens*, (CCT 5843 ATCC 12706), adquirida na Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, Brasil) e estocada no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

A cepa foi reidratada conforme indicação, cultivada em meio de cultivo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) - *Lactobacillus* (Difco) e estocada em microtubos de polipropileno com meio MRS contendo 20% de glicerol a -24°C , até a utilização.

3.2 PREPARAÇÃO DO PRÉ-CULTIVO

O preparo do pré-cultivo foi realizado em meio de cultivo MRS, em *erlenmeyer* de 250 mL, com volume útil de 160 mL. A cepa foi reativada no meio MRS a 30°C por 18 h, a partir da cepa congelada a -24°C em glicerol (20 %). O tempo de incubação foi estabelecido com base em estudos prévios realizados no ENGEBIO por Camargo (2015), que indicaram que neste tempo a bactéria se encontra na fase estacionária ($\sim 10^9$ UFC/mL).

3.3 PREPARO E CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS DE CULTIVO

O experimento foi conduzido de maneira que do pré-cultivo na fase estacionária de crescimento fosse retirada uma alíquota de 1 mL e assim foram realizadas diluições sucessivas em tubos contendo 9,0 mL de caldo MRS (0,1%) até atingir a concentração de aproximadamente 10^5 UFC/mL (inóculo). O experimento foi realizado em *erlenmeyers* de 400 mL, com volume útil de 320 mL e com 1 % (v/v) de inóculo (10^5 UFC/mL) correspondendo a aproximadamente 10^3 UFC/mL como concentração inicial. Tal concentração foi utilizada a fim de simular as concentrações bacterianas iniciais presentes em produtos cárneos. Os

frascos foram incubados em estufa BOD (Dist, Florianópolis, Brasil), em diferentes condições não isotérmicas.

Foram avaliados sete diferentes perfis de temperaturas. No perfil chamado PNI-1, foi avaliada a variação de temperatura decrescente entre 16-12-8-4 °C; no perfil chamado PNI-2, foi avaliada a variação de temperatura decrescente entre 25-20-16-12-8-4 °C; no perfil chamado PNI-3, foi avaliada a variação de temperatura decrescente seguida de variação crescente entre 12-8-4-8-12 °C; no perfil chamado PNI-4, foi avaliada a variação de temperatura crescente entre 12-16-20-25 °C; e no perfil chamado PNI-5, foi avaliada a variação de temperatura crescente entre 4-8-12-16 °C; no perfil chamado PNI-6, foi avaliada a oscilação de temperatura na prateleira superior do refrigerador doméstico (~ 6-12 °C) e no perfil chamado PNI-7, foi avaliada a oscilação de temperatura na prateleira inferior do refrigerador doméstico (~ 5-9 °C). A Tabela 2 apresenta os intervalos de tempo de cada temperatura das condições isotérmicas.

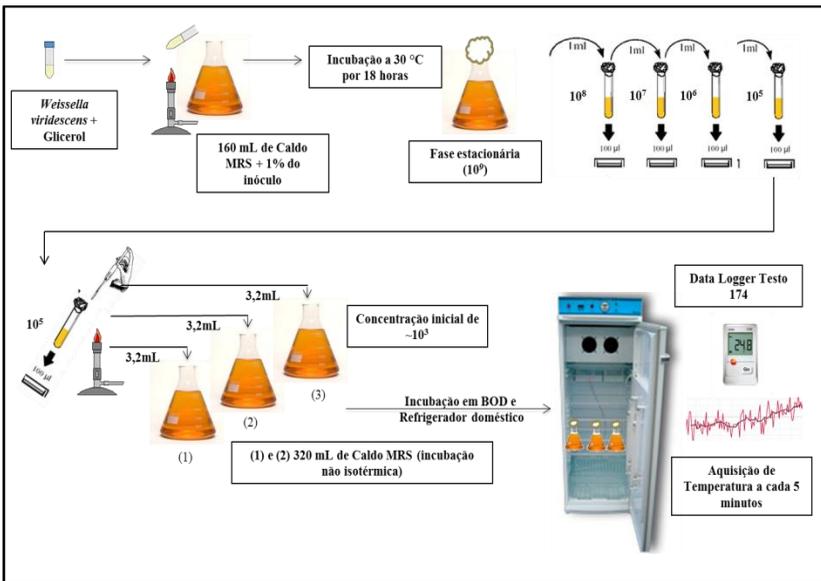
Tabela 2. Intervalos de tempo (horas) para cada temperatura dos perfis não isotérmicos.

Perfis de Temperatura	Tempo em cada temperatura (horas)						Tempo total (horas)
	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	25 °C	
PNI-1 (16-12-8-4 °C)	119,06	40,98	20,08	11,88	-	-	192
PNI-2 (25-20-16-12-8-4 °C)	96,40	34,15	16,73	9,90	6,53	4,29	168
PNI-3 (12-8-4-8-12 °C)	104,64	34,15 (D e C)	16,73 (D) e 58,33 (C)	-	-	-	248
PNI-4 (12-16-20-25 °C)	-	-	20,08	11,88	7,84	20,20	60
PNI-5 (4-8-12-16 °C)	63,00	28,60	13,40	63,00	-	-	168

D= na fase decrescente e C= na fase crescente.

Em todos os experimentos, a temperatura foi registrada a cada 5 minutos por *mini data loggers* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha), sendo conduzidos até a fase estacionária do crescimento ($\sim 10^9$ UFC/mL). A Figura 3 apresenta o esquema ilustrativo do preparo do cultivo até a incubação da cultura, realizado neste estudo.

Figura 3. Esquema ilustrativo do preparo e realização dos cultivos não isotérmicos de *W. viridescens* em MRS.



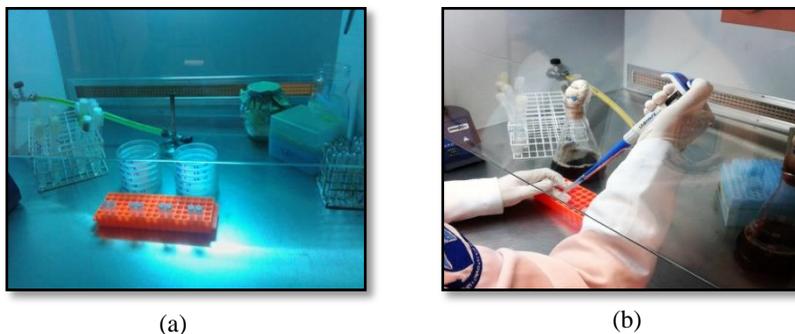
Fonte: Martins, 2015.

3.4 OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

Para construção das curvas de crescimento de *W. viridescens*, sob condições não isotérmicas, utilizou-se a técnica de plaqueamento (Figura 4) em profundidade até que a contagem de células viáveis atingisse a fase estacionária. No plaqueamento, foi utilizado ágar Man, Rugosa e Sharpe (MRS, Difco) com dupla camada, em placas de Petri estéreis descartáveis, e as placas foram incubadas em estufa BOD a 30 °C por 48 h. Os experimentos foram feitos em duplicata, obtendo-se dois dados de crescimento em cada ponto de coleta. As placas com

colônias desenvolvidas em número de 25 a 250 foram selecionadas e procedida a contagem. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL da amostra.

Figura 4. (a) Material utilizado no experimento, em câmara de fluxo laminar com luz UV e (b) procedimento do plaqueamento por profundidade.



3.5 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

Em trabalho anterior do grupo, foi realizado o levantamento microbiológico de *W. viridescens* em seis condições isotérmicas de cultivo. As condições do cultivo isotérmico foram: temperatura ótima de crescimento (30 °C), temperaturas abusivas (12, 16 e 20 °C) e temperaturas de refrigeração (4 e 8 °C) (CAMARGO, 2015).

A partir dos dados brutos, os parâmetros de crescimento foram obtidos, no presente trabalho, a partir do ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts (Equações 2.1, 2.2 e 2.3) aos dados experimentais, para cada temperatura testada.

3.5.1 Modelos secundários

Após a obtenção do parâmetro primário da velocidade específica máxima de crescimento $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1}), quatro equações correspondentes aos modelos secundários (Tabela 3) foram comparadas para seleção do modelo que melhor descreva a influência da variação da temperatura sobre este parâmetro. Os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ foram obtidos às temperaturas isotérmicas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C. O ajuste do modelo secundário selecionado e os resíduos do ajuste foram obtidos pelo Microsoft Office Excel[®] (2010).

Tabela 3. Modelos secundários avaliados para descrever a influência da temperatura no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento de *W. viridescens*.

Modelos secundários	Equação
Linear	$\mu = aT + b$
Raiz quadrada	$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min})$
Tipo Arrhenius	$\ln \mu = a\left(\frac{1}{T}\right) + b$
Exponential	$\mu = a.\exp(bT)$

As médias para o parâmetro da população máxima atingida $Y_{máx}$ [ln (UFC/mL)] foram utilizadas como modelo secundário.

3.6 PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *W. viridescens*

A predição do crescimento de *W. viridescens* foi abordada de duas formas para cada perfil não isotérmico avaliado: (i) utilizando o melhor modelo secundário selecionado em conjunto com o valor de $Y_{máx}$ ponderado, como por exemplo, para o PNI-1 o valor de $Y_{máx}$ ponderado está descrito na Equação 3.1; (ii) utilizando o melhor modelo em conjunto com o valor de $Y_{máx}$ geral. Já a predição para os perfis não isotérmicos obtidos em refrigerador doméstico foi utilizada apenas a última abordagem, devido variação entre apenas duas temperaturas diferentes das estudadas no crescimento isotérmico, impossibilitando obter um $Y_{máx}$ ponderado.

$$Y_{máx} \text{ ponderado} = \left[\frac{t_i * Y_{máx}^{4°C} + t_i * Y_{máx}^{8°C} + t_i * Y_{máx}^{12°C} + t_i * Y_{máx}^{16°C}}{t_{total}} \right] \quad (3.1)$$

em que t_i é o intervalo de tempo em cada temperatura e t_{total} é o tempo total de experimento.

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) na forma diferencial (Equações 3.2 e 3.3) foi utilizado para prever o crescimento de *W.*

viridescens nas condições não isotérmicas avaliadas, com as respectivas condições iniciais (Equações 3.4 e 3.5):

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{\max} \left[\frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] \{1 - \exp[y(t) - y_{\max}]\} \quad (3.2)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{\max} \quad (3.3)$$

$$Q(0) = Q_0 \quad (3.4)$$

$$y(0) = y_0 \quad (3.5)$$

$$Q_0 = -\ln[\exp(h_0) - 1] \quad (3.6)$$

em que $y(t)$ é o logaritmo natural da contagem microbiana no tempo t , ou seja, $y(t) = \ln(N(t))$; $Q(t)$ é a função do estado fisiológico das células ($Q(t) = \ln(q(t))$); e os parâmetros μ_{\max} e Y_{\max} são funções da temperatura, descritos pelo modelo secundário; y_0 é o valor do logaritmo natural da contagem bacteriana inicial, ou seja, $y(0) = \ln[N_0]$, e Q_0 é o valor do estado fisiológico inicial das células, sendo que Q_0 se relaciona com o parâmetro h_0 , como descrito pela Equação 3.6.

3.7 ANÁLISES NUMÉRICAS

A predição das curvas de crescimento de *W. viridescens*, em diferentes perfis de temperatura foi realizada com o auxílio do *software* Matlab 7 (MathWorks®, Natick, USA). A resolução das equações

diferenciais foi feita através da função *ode23*, em rotinas computacionais programadas e executadas no Matlab 7, que é baseada no método de Runge-Kutta, aplicando as condições iniciais já apresentadas na seção 3.6, como abordado por Longhi (2012).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os índices estatísticos coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) (SOPER, 1917), erro quadrático médio (RMSE), fator bias e fator exatidão foram utilizados para avaliar a capacidade preditiva do modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994). As equações referentes aos índices estatísticos (ROSS, 1996) estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Índices estatísticos para validação do modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994).

Índice estatístico	Equação
R^2_{aj}	$R^2_{aj} = 1 - \left[\frac{num-1}{num-var+1} \right] \left[1 - \frac{\left[\sum (pd_i - \overline{pd}) [ob_i - \overline{ob}] \right]^2}{\sum (pd_i - \overline{pd})^2 \sum (ob_i - \overline{ob})^2} \right]$
RMSE	$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (ob_i - pd_i)^2}{n - p}}$
Fator bias	$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(pd_i/ob_i)}{n} \right)}$
Fator exatidão	$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum \log(pd_i/ob_i) }{n} \right)}$

onde n é o número de dados experimentais, p é o número de parâmetros do modelo, pd_i e ob_i são os dados preditos e observados, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTABELECIMENTO DOS MODELOS SECUNDÁRIOS

Neste estudo, os modelos secundários linear, raiz quadrada, equação tipo Arrhenius e exponencial, foram ajustados aos dados experimentais de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de *W. viridescens* no intervalo de temperatura de 4 a 30 °C.

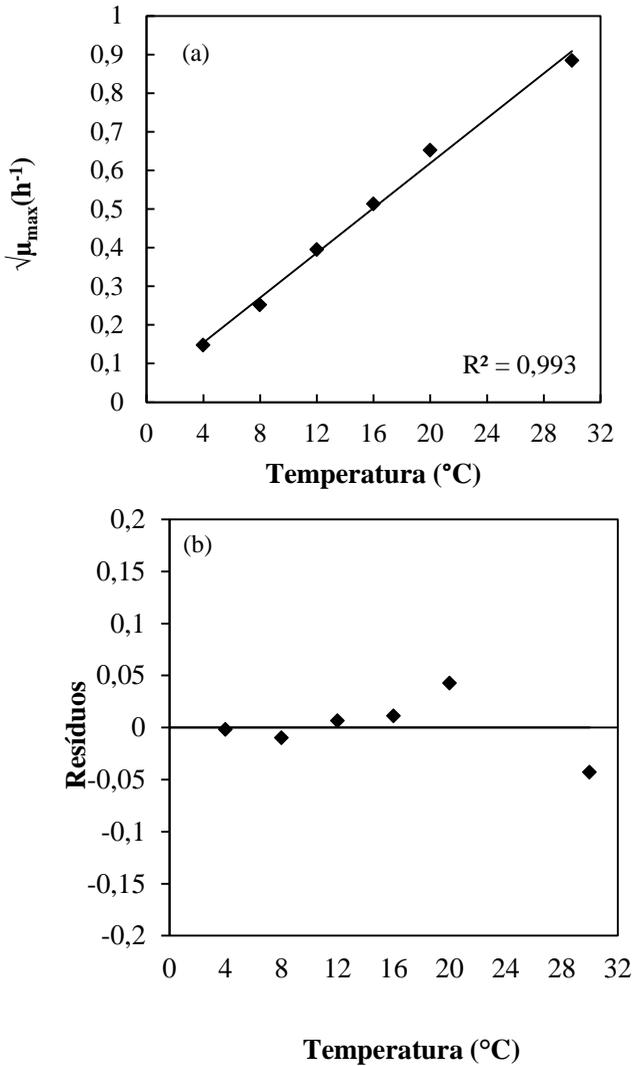
A escolha do modelo secundário foi baseada na comparação dos coeficientes de correlação (R^2), obtidos pelos ajustes dos quatro modelos secundários, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre o parâmetro velocidade específica máxima de crescimento de *W. viridescens*.

Modelo	Equação	R^2
Linear	$\mu_{\text{máx}} = 0,03*(T) - 0,1668$	0,9706
Tipo Arrhenius	$\ln(\mu_{\text{máx}}) = -15,518*(1/T) - 0,259$	0,8983
Exponencial	$\mu_{\text{máx}} = 0,0217*\exp^{0,134*T}$	0,9069
Raiz Quadrada	$\sqrt{\mu_{\text{máx}}} = 0,029*(T + 1,32)$	0,9930

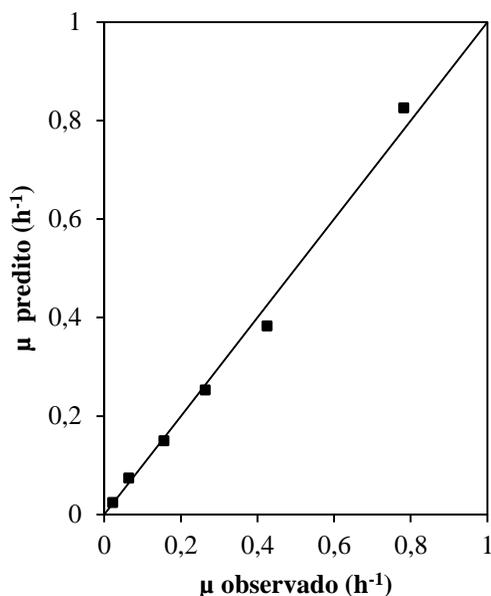
O modelo da Raiz quadrada representou bem a dependência de $\mu_{\text{máx}}$ com a temperatura, com valor de R^2 acima de 0,99, como apresentado na Tabela 5. Na Figura 5, é apresentado o ajuste do modelo secundário e o gráfico dos resíduos de comparação dos dados experimentais com o ajuste do modelo. Os maiores resíduos foram observados para as temperaturas de 20 e 30 °C. Longhi (2012) afirmou que a habilidade dos modelos secundários em representar a dependência dos parâmetros com a temperatura influencia a predição do crescimento em condições não isotérmicas. Desta forma, a capacidade preditiva do modelo em descrever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas depende muito do bom ajuste dos modelos secundários.

Figura 5. Influência da temperatura sobre a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de *W. viridescens*. A linha contínua representa o ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados experimentais (a). Os resíduos decorrentes do ajuste do modelo são apresentados na Figura (b).



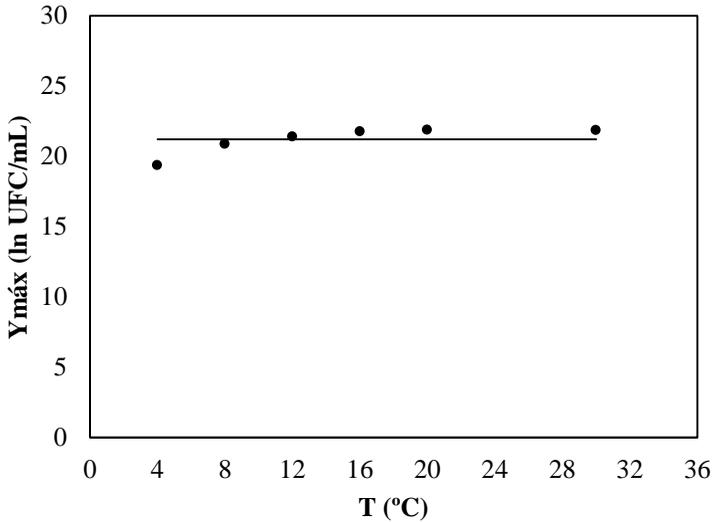
A Figura 6 apresenta os valores observados vs preditos pelo modelo secundário da raiz quadrada para o parâmetro ($\mu_{\text{máx}}$) de crescimento de *W. viridescens*. Pela análise da Figura 6, é possível perceber que, em geral, os valores preditos e observados estão próximos à linha de equivalência. A análise conjunta da Figura 6 e dos índices estatísticos bias (1,0248) e fator de exatidão (1,0546) demonstra que o modelo secundário proposto pode ser usado para prever a velocidade específica de crescimento de *W. viridescens*, no intervalo de temperatura de 4 a 30 °C.

Figura 6. Relação entre os valores do parâmetro de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) observados vs preditos pelo modelo secundário da raiz quadrada obtido para *W. viridescens*.



Os valores do parâmetro $Y_{\text{máx}}$, que está relacionado com a população máxima atingida, obtidos nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C estão apresentados na Figura 7.

Figura 7. Valores do parâmetro população máxima de crescimento atingida ($Y_{m\acute{a}x}$) em função da temperatura (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C). A linha contínua representa a média.



A média aritmética dos valores do parâmetro $Y_{m\acute{a}x}$ para todas as temperaturas foi utilizada como modelo secundário (Figura 7). Devido à influência da temperatura neste parâmetro de crescimento, foi avaliado o efeito na predição do crescimento microbiano em condições não isotérmicas. Desta forma, os valores fixos deste parâmetro dentro de cada faixa de temperatura foram descritos em dois casos: (i) foi considerada a média ponderada com o tempo em que cada temperatura permanece no experimento, considerando apenas as temperaturas das condições não isotérmicas avaliadas, sendo este valor chamado de $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado, como apresentado na equação 3.1; (ii) foi considerada a média aritmética dos valores de $Y_{m\acute{a}x}$ obtidos no intervalo de temperatura de 4 a 30 °C, sendo este valor chamado de $Y_{m\acute{a}x}$ geral utilizado na predição do crescimento de *W.viridescens* nas cinco condições não isotérmicas avaliadas. Já a predição para os perfis não isotérmicos obtidos em refrigerador doméstico foi utilizada apenas a última abordagem, devido às inúmeras oscilações de temperatura que ocorrem ao longo do tempo, impossibilitando a obtenção de um $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado.

Os valores médios ponderados do parâmetro relacionado a população máxima atingida ($Y_{m\acute{a}x}$) para cada perfil não isotérmico estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores do parâmetro $Y_{m\acute{a}x}$ ponderado estimados para os perfis não isotérmicos estudados para prever o crescimento de *W. viridescens*.

Parâmetro	Perfis não isotérmicos				
	PNI-1	PNI-2	PNI-3	PNI-4	PNI-5
* $Y_{m\acute{a}x}$					
Ponderado	20,0	20,1	20,4	21,7	20,7
[ln (UFC/mL)]					

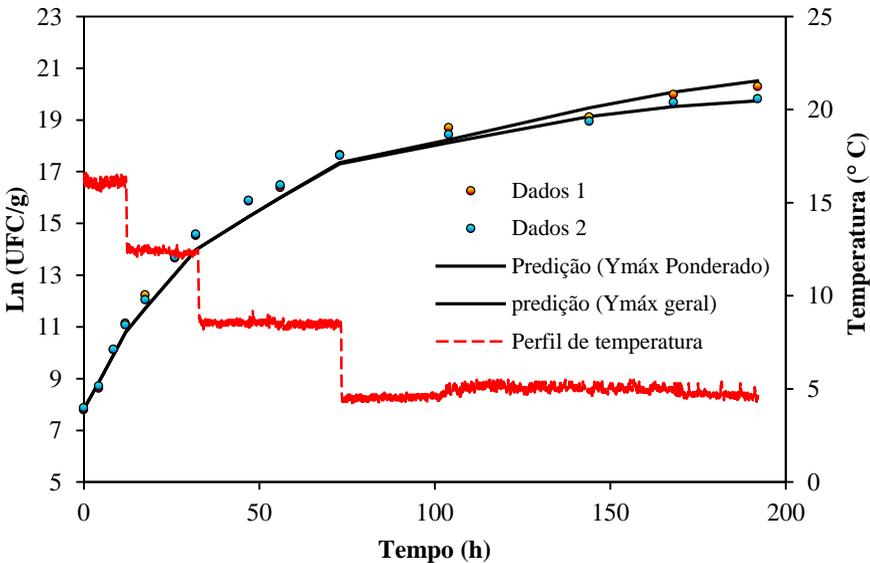
O valor da média aritmética calculada para o parâmetro $Y_{m\acute{a}x}$ geral foi de 21,2 [ln (UFC/mL)] (com desvio padrão da média igual a 0,72). É possível notar que os valores médios ponderados do parâmetro $Y_{m\acute{a}x}$ para os perfis não isotérmicos (PNI-1, PNI-2, PNI-3 e PNI-5) foram menores que o valor de $Y_{m\acute{a}x}$ geral. Já o valor médio ponderado do parâmetro $Y_{m\acute{a}x}$ para o perfil não isotérmico (PNI-4) foi maior do que o $Y_{m\acute{a}x}$ geral, com valor de 21,7 [ln (UFC/mL)], este fato pode ser explicado devido o PNI-4 apresentar intervalos de tempo maior em temperaturas mais elevadas.

Longhi et al. (2013), ao avaliarem a capacidade de predição de diferentes modelos matemáticos para o crescimento de *Lactobacillus plantarum* sob condições não isotérmicas, observaram que o parâmetro $Y_{m\acute{a}x}$ dos modelos de Baranyi e Roberts (1994), Fujikawa, Kai e Morozum (2004) e Huang (2008), e o parâmetro a do modelo Logístico Modificado por Corradini e Peleg (2005), para os perfis não isotérmicos, foram maiores do que os valores observados nos experimentos. Os autores concluem que, para estes modelos, o valor mais baixo do parâmetro ($Y_{m\acute{a}x}$ ou a) sempre causa um deslocamento para baixo da predição e que não é muito importante, na porção inicial da curva, mas de maior importância para prever a fase próxima à população máxima.

4.2. CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS

As curvas de crescimento de *W. viridescens*, em condições não isotérmicas envolvendo temperaturas de 4 a 30 °C, previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) equações 3.1 e 3.2, considerando-se os perfis de temperatura PNI-1, PNI-2, PNI-3, PNI-4 e PNI-5 são apresentadas, respectivamente, nas Figuras 8, 9, 10, 11 e 12.

Figura 81. Crescimento de *W. viridescens* submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-1), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{máx}$ ponderado e $Y_{máx}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.

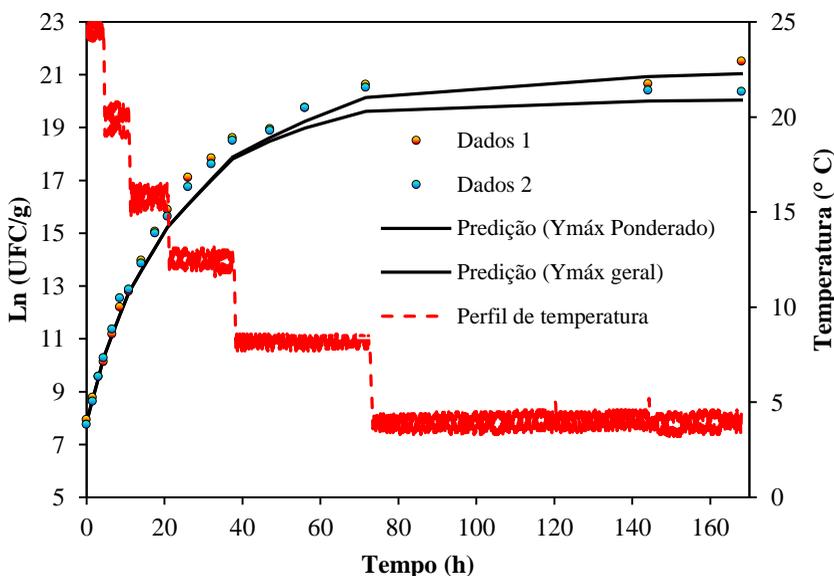


No perfil de temperatura decrescente, PNI-1, a curva de crescimento não apresentou fase de adaptação devido à temperatura de abuso (16 °C) no início da cultura (Figura 8). Nota-se que as curvas previstas interceptam-se até aproximadamente 73 horas de cultura e estão

abaixo dos dados na fase de máximo crescimento, indicando uma falha perigosa do modelo.

No perfil de temperatura decrescente PNI-2, que apresenta uma faixa mais ampla de temperatura (dentro do intervalo de 4 a 25 °C), o modelo apresentou as previsões próximas aos dados experimentais no início da curva (no decréscimo de 25 para 16 °C), mas subestimou a parte exponencial da curva, indicando assim, que o modelo falhou de forma perigosa.

Figura 9. Crescimento de *W. viridescens* submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-2), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{máx}$ ponderado e geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.

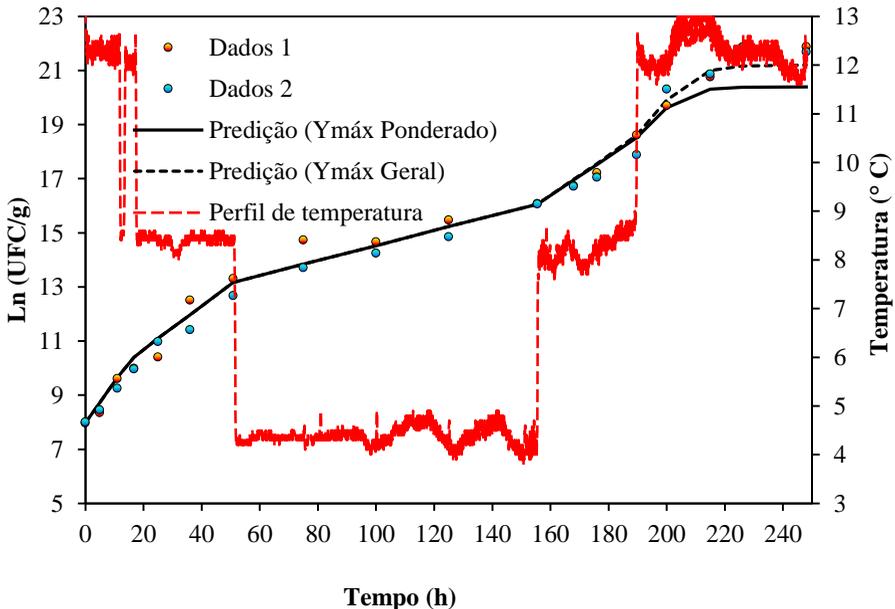


Ao comparar os dois perfis decrescentes (PNI-1 e PNI-2), é possível notar que quando submetida à variação de temperaturas das mais altas para temperaturas mais baixas, a bactéria cresce mais rápido do que o previsto pelo modelo, ou seja, a velocidade específica máxima é maior do que o previsto pelo modelo secundário. No perfil PNI-1, as mudanças de temperatura ocorrem em intervalos maiores do que as mudanças ocorridas no perfil PNI-2 e é possível notar que o modelo subestima mais os dados no PNI-2 do que o PNI-1. Isto poderia ser

explicado por um maior tempo de adaptação do microrganismo no PNI-1 do que no PNI-2, fazendo que, no último caso, a bactéria não apresente o comportamento previsto no modelo secundário.

A partir dos dados da Figura 10, no PNI-3, nota-se o modelo previu bem o crescimento em toda curva. Este fato pode ser explicado devido ao longo intervalo de tempo em que a bactéria permanece em cada temperatura, permitindo assim uma nova adaptação, que pode ser prevista pelo modelo. Por exemplo, na temperatura de 4 °C a bactéria permanece nesta condição por aproximadamente 104 horas, tempo suficiente para a bactéria se adaptar e apresentar o comportamento previsto no modelo. Segundo Hudson (1993), as células microbianas adaptadas a temperaturas mais altas e então transferidas para temperaturas mais baixas por muito tempo apresentam fase de atraso mais longa. Ainda é possível notar que a predição, em que se utiliza a abordagem do $Y_{máx}$ geral, manteve-se mais próxima aos dados experimentais no final da curva.

Figura 10. Crescimento de *W. viridescens* submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-3), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{máx}$ ponderado e $Y_{máx}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.



No perfil de temperatura PNI-4, que apresenta temperaturas de abuso (12-16-20-25 °C) mais próximas à temperatura ótima de crescimento de *W. viridescens*, o modelo previu bem o crescimento em ambas as abordagens de Y_{max} avaliadas ($R^2_{aj} > 0,99$) (Figura 11). Dalcanton (2010) estudou a cinética de crescimento de *L. plantarum* na condição não isotérmica (20-30 °C) próxima à temperatura ótima de crescimento com o modelo de Gompertz. Os resultados demonstraram que o modelo previu perfeitamente a curva experimental de crescimento. Longhi (2012) modelou os dados experimentais de *L. plantarum* obtidos por Dalcanton (2010) com seis diferentes modelos matemáticos e os resultados demonstraram que as temperaturas moderadas do perfil 20-30 °C contribuíram para as boas respostas de predição dos modelos avaliados.

Figura 11. Crescimento de *W. viridescens* submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-4), preditas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{máx}$ ponderado e $Y_{máx}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.

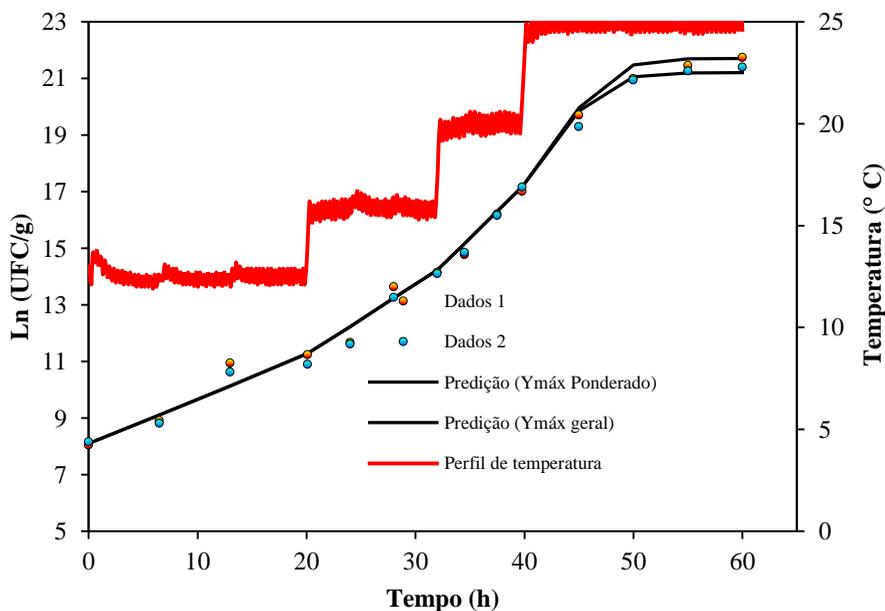
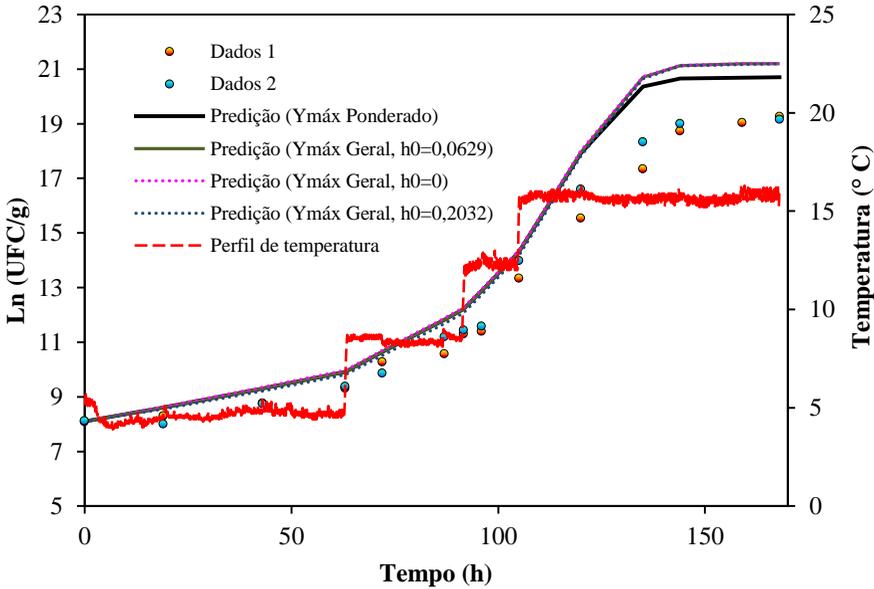


Figura 12. Crescimento de *W. viridescens* submetido às condições não isotérmicas do perfil (PNI-5), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{máx}$ ponderado e $Y_{máx}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.



A partir dos dados de crescimento de *W. viridescens* apresentados na Figura 12 (PNI-5), é possível notar que as previsões utilizando valores de $Y_{máx}$ ponderado e geral foram maiores que os valores observados experimentalmente, o que causou uma predição acima dos dados experimentais, no final da curva. Esse fato foi explicado por Longhi (2012) que afirma que, para temperaturas muito inferiores à temperatura ótima de crescimento, o valor da população máxima atingida tende a ser inferior, devido ao possível efeito provocado pela temperatura na fisiologia do microrganismo. No presente caso, o microrganismo não muda tão rapidamente o valor de $\mu_{máx}$, como previsto no modelo. Pode-se considerar que mudanças na temperatura de 4 a 12 °C resultaram em fases *lag* intermediárias, pois o modelo superestimou os dados em praticamente toda curva de crescimento. Estes resultados corroboram com Longhi (2012) que, ao avaliar a capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o

crescimento microbiano em condições não isotérmicas, verificou que mudanças bruscas de temperatura, especialmente em torno da temperatura teórica de mínimo crescimento (T_{\min}), para os perfis 4-12 °C e 5-15 °C, no crescimento de *Lactobacillus plantarum*, causou uma nova fase de adaptação que não pôde ser predita pelos modelos avaliados. Zwietering et al. (1994) avaliaram o efeito de mudanças de temperatura no crescimento de *Lactobacillus plantarum* com o modelo de Gompertz Modificado, e concluíram que o modelo apresentou baixa capacidade preditiva para temperaturas próximas de T_{\min} .

Devido ao grande valor do desvio padrão observado no parâmetro h_0 (0,0629 com desvio padrão da média igual a 0,1403), foi avaliada influência da mudança dos valores do parâmetro h_0 na predição do crescimento de *W. viridescens* no perfil PNI-5, considerando os limites do desvio apresentado, ou seja valor igual a 0,0629 e 0,2032, para avaliar a influência da variação deste parâmetro na faixa do desvio observado. Na Figura 12, não é possível notar diferença entre as predições utilizando diferentes valores do parâmetro h_0 . Camargo (2015) avaliou a predição do crescimento de *Lactobacillus plantarum* na condição não isotérmica de 12-20 °C e concluiu que não havia influência da variação dos valores do parâmetro h_0 dentro da faixa do desvio obtido experimentalmente.

Os valores de R_{aj}^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão das predições de crescimento de *W. viridescens* nos cinco perfis não isotérmicos avaliados estão apresentados na Tabela 7. Para todos os perfis não isotérmicos os valores de R_{aj}^2 foram maiores que 0,980.

Verifica-se que o modelo testado apresentou previsão segura, com fator bias maior que 1, no PNI-3, PNI-4 e no PNI-5 em ambas as abordagens estudadas, indicando que o valor do parâmetro Y_{\max} (geral ou ponderado) não influencia na segurança da predição. No PNI-5, as curvas preditas pelo modelo superestimaram os dados em todas as fases da curva de crescimento, o mesmo não foi observado no perfil PNI-2 em que o modelo superestimou os dados apenas na fase inicial da curva de crescimento.

A capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts (1994) foi menor quando ocorreram variações de temperatura crescente a partir da refrigeração e o modelo apresentou melhor capacidade preditiva no PNI-4 (Y_{\max} geral), com um RMSE de 0,3341, R^2 de 0,9939, Fator bias de 1,0046 e Fator de exatidão de 1,0197. As temperaturas moderadas deste perfil (12-16-20-25 °C) contribuíram para uma boa predição do modelo.

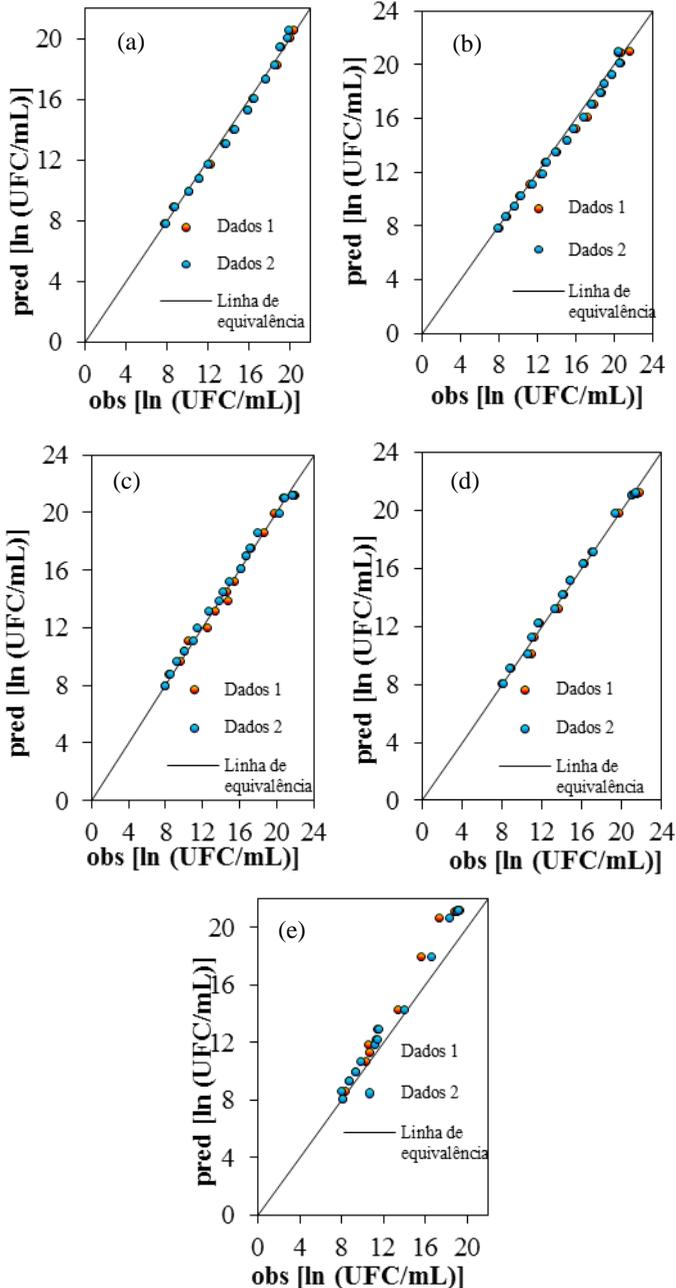
De acordo com os índices estatísticos RMSE, Fator bias e Fator de exatidão, a abordagem utilizada com o parâmetro $Y_{máx}$ geral melhorou a predição nos perfis não isotérmicos PNI-3 e PNI-4, pois devido às temperaturas ótimas de crescimento presentes nestes perfis, o valor do máximo crescimento atingindo foi próximo ao valor do parâmetro $Y_{máx}$ geral (21,2).

A Figura 13 apresenta os valores observados vs valores preditos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994) para os dados de crescimento de *W. viridescens* nos perfis não isotérmicos avaliados, com a abordagem do $Y_{máx}$ geral. Analisando a Figura 13, é possível notar que os valores preditos e valores observados estão próximos à linha de equivalência, exceto no PNI-5 em que os dados preditos no final da curva foram maiores que os observados no experimento.

Tabela 7. R_{aj}^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão da predição do crescimento de *Weissella viridescens* pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) nos cinco perfis de temperatura.

Perfis de Temperatura	Índices estatísticos			
	Predição ($Y_{máx}$ ponderado)			
	R_{aj}^2	RMSE	Fator bias	Fator exatidão
PNI-1 (16-12-8-4 °C)	0,9955	0,3973	0,9805	1,0247
PNI-2 (25-20-16-12-8-4 °C)	0,9968	0,5850	0,9736	1,0288
PNI-3 (12-8-4-8-12 °C)	0,9862	0,6064	1,0008	1,0294
PNI-4 (12-16-20-25 °C)	0,9950	0,3667	1,0098	1,0215
PNI-5 (4-8-12-16 °C)	0,9892	1,2943	1,0766	1,0767
	Predição ($Y_{máx}$ geral)			
	R_{aj}^2	RMSE	Fator bias	Fator exatidão
PNI-1 (16-12-8-4 °C)	0,9910	0,4129	0,9872	1,0257
PNI-2 (25-20-16-12-8-4 °C)	0,9923	0,4665	0,9816	1,0244
PNI-3 (12-8-4-8-12 °C)	0,9918	0,4147	1,0082	1,0242
PNI-4 (12-16-20-25 °C)	0,9939	0,3341	1,0046	1,0197
PNI-5 (4-8-12-16 °C)	0,9901	0,6380	1,0827	1,0828

Figura 13. Relação entre os dados de crescimento observados vs preditos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts obtidos para *W. viridescens* nos perfis de temperatura: (a) PNI-1 (b) PNI-2 (c) PNI-3 (d) PNI-4 e (e) PNI-5.



4.3 PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *W. viridescens* EM REFRIGERADORES DOMÉSTICOS

Neste tópico estão apresentados os resultados da predição do crescimento de *W. viridescens* em condições não isotérmicas, envolvendo temperaturas de refrigeração em refrigeradores domésticos.

Os dados experimentais de crescimento de *W. viridescens* sob condições não isotérmicas, as curvas preditas pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994) e o perfil de tempo-temperatura obtidos na prateleira superior e inferior dos refrigeradores domésticos estão apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Em relação aos perfis não isotérmicos, é possível notar diferentes variações de temperatura entre a parte superior (PNI-6: 6-12 °C) e inferior (PNI-7: 5-9 °C) do refrigerador. Esta variação corrobora com estudos apresentados por James et al., (2008), que mostravam amplas faixas de variação de temperatura dentro de refrigeradores domésticos, em que apenas 2,3% dos refrigeradores domésticos operavam com uma temperatura menor que 6 °C, 34,1% operavam em uma faixa de 8-12 °C, 34,1% operavam dentro da faixa de 12-14 °C e 29,5% operavam em temperaturas maiores que 14 °C. Este estudo mostrou ainda que mais de 70% dos refrigeradores domésticos possui temperatura superior a 6 °C. Os autores afirmam que esta variação pode ser relacionada à regulação da temperatura do termostato e à abertura de porta durante o uso. Para alimentos altamente perecíveis, tais como carnes e seus derivados, a temperatura de conservação não deve ser superior a 2-4 °C, dependendo do tipo de produto (LAGUERRE et al., 2002).

De acordo com os resultados da predição do crescimento microbiano, observa-se que, para os dois perfis de temperatura, as curvas de crescimento não isotérmicas preditas pelo modelo matemático superestimaram o crescimento de *W. viridescens*, com relação aos dados experimentais, principalmente na fase de máximo crescimento.

Figura 14. Crescimento de *W. viridescens* submetido às condições não isotérmicas do perfil PNI-6 (prateleira superior), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{máx}$ ponderado e $Y_{máx}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.

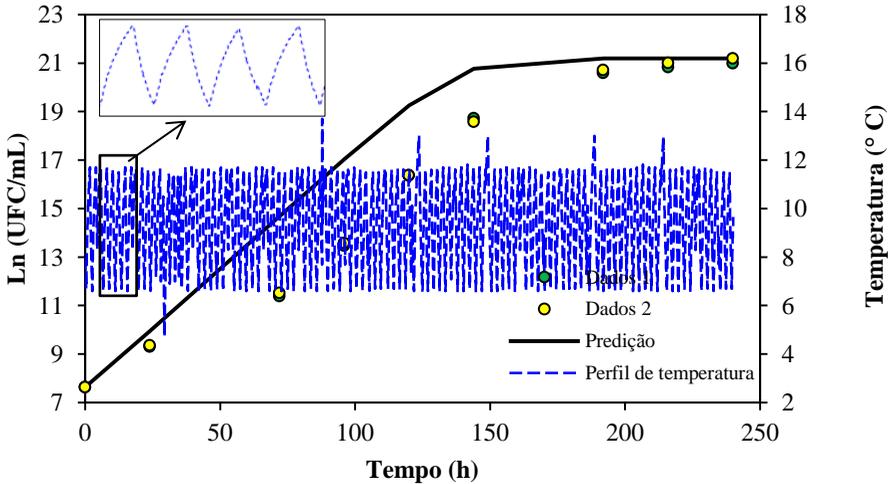
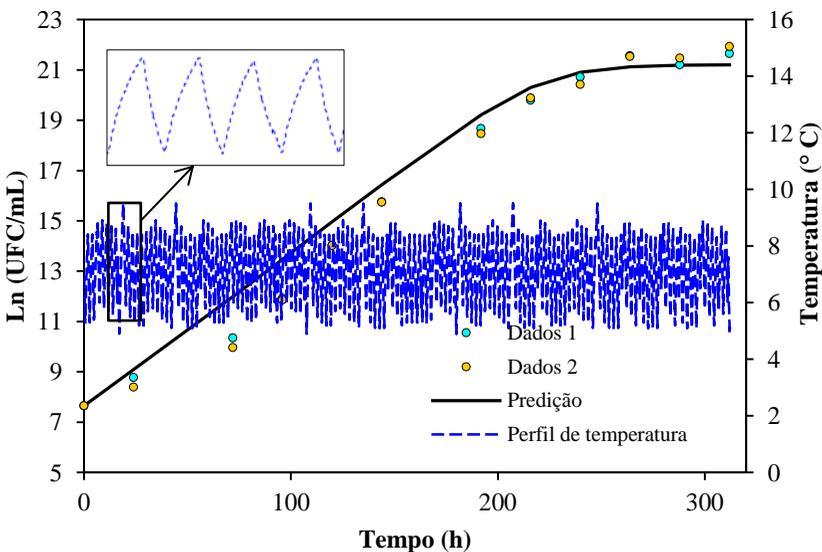


Figura 15. Crescimento de *W. viridescens* submetido às condições não isotérmicas do perfil PNI-7 (prateleira inferior), previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts, considerando-se $Y_{máx}$ ponderado e $Y_{máx}$ geral, e validada pelos dados experimentais 1 e 2.



Os valores de R_{aj}^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão das predições de crescimento de *W. viridescens* nas duas condições não isotérmicas em refrigerador doméstico estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. R_{aj}^2 , RMSE, Fator bias e Fator exatidão da predição do crescimento de *Weissella viridescens* pelo modelo de Baranyi e Roberts na prateleira superior e inferior do refrigerador doméstico.

Perfis não isotérmicos	Índices estatísticos			
	R_{aj}^2	RMSE	Fator Bias	Fator exatidão
Prateleira superior (6-12 °C)	0,9077	2,0157	1,1004	1,1004
Prateleira inferior (5-9 °C)	0,9822	0,8708	1,0412	1,0505

Neste estudo, o perfil não isotérmico na faixa de oscilação de temperatura mais próxima da ótima (prateleira superior, ~ 6-12 °C) a amplitude de oscilação de temperatura foi maior do que na prateleira inferior (~ 5-9 °C) que apresenta uma amplitude menor de temperatura. Assim, o modelo previu bem o crescimento de *W. viridescens* em temperaturas próximas a T_{min} , pois, a amplitude de oscilação de temperatura é menor.

Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Longhi (2012), em que vários modelos matemáticos apontaram falha na predição em condições não isotérmicas. O autor explica que estas falhas podem ter ocorrido devido à existência de fases de adaptação intermediária do microrganismo, as quais podem ser atribuídas às mudanças bruscas de temperatura em amplitudes moderadas (maiores que 5 °C).

Os valores dos índices estatísticos apresentados na tabela 8 indicam que o modelo avaliado fornece predições seguras do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo por predizer um crescimento superior ao observado experimentalmente (falha segura) com um valor do fator bias, para ambos os perfis de temperatura, maior que 1.

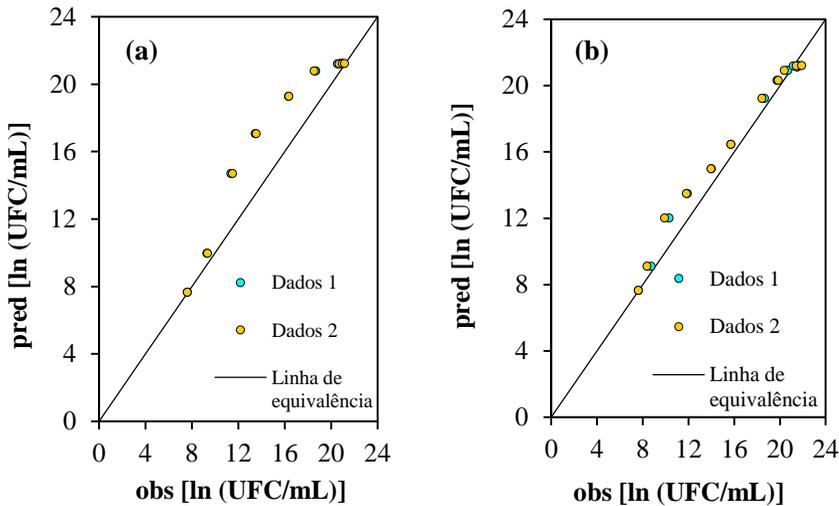
O modelo apresentou melhor capacidade preditiva no perfil de temperatura da prateleira inferior com um valor de R_{aj}^2 de 0,9822,

RMSE de 0,8708, e Fator de exatidão de 1,0505. Com base nessas informações, pode-se afirmar que o modelo de Baranyi e Roberts (1994) pode melhor prever os dados de crescimento nas condições não isotérmicas no perfil da prateleira inferior do refrigerador (5-9 °C) por apresentar índices estatísticos melhores, quando comparado aos dados obtidos na prateleira superior.

Analisando a Figura 16, em conjunto com os índices estatísticos obtidos, pode-se afirmar que o modelo apresenta melhor capacidade preditiva nas condições não isotérmicas da prateleira inferior do refrigerador, pois os valores preditos e valores observados no PNI-7 (Figura 16b) estão mais próximos à linha de equivalência.

De acordo com os resultados da predição do crescimento de *W. viridescens* em condições não isotérmicas em refrigeradores domésticos, pode-se afirmar que, quanto maior for a amplitude e o número oscilações e as mudanças de temperatura, maior será a dificuldade para prever o crescimento.

Figura 16. Relação entre os dados de crescimento observados vs preditos pelo modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts obtidos para *W. viridescens* nos perfis de temperatura: (a) PNI-6 e (b) PNI-7.



5. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer os modelos secundários que descrevem a influência da temperatura para os parâmetros velocidade específica máxima ($\mu_{máx}$) (modelo da raiz quadrada) e população máxima atingida ($Y_{máx}$) (média dos valores).

Na validação do modelo foi observada fase *lag* intermediária havendo superestimação do modelo quando ocorreram variações de temperatura que iniciaram na temperatura de refrigeração. Para perfis de temperatura crescente, com temperatura inicial acima da temperatura de refrigeração o modelo previu bem o crescimento, não havendo fase *lag* intermediária.

Sob variações bruscas de temperatura, a bactéria parece não ter tido tempo de se adaptar às novas condições e o modelo não previu bem o crescimento. Quando a bactéria teve tempo para se adaptar à nova condição de temperatura, mesmo à temperatura de refrigeração, o modelo foi capaz de prever bem o crescimento.

Nos perfis de temperatura de refrigeradores, o modelo foi capaz de prever de forma segura o crescimento de *Weissella viridescens*. Entretanto, para condições de menor oscilação de temperatura, a predição foi melhor, mesmo para temperatura próxima a T_{min} .

O modelo preditivo estudado tem a possibilidade de ser utilizado para prever a vida útil de produtos cárneos cuja deterioração ocorra, principalmente, em consequência do crescimento de *Weissella viridescens*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMONACID-MERINO, S.F., TORRES, J.A. Mathematical models to evaluate temperature abuse effects during distribution of refrigerated solid food. **J. Food Eng.** v. 20, p. 223–225, 1993.
- AUDENAERT, K.; HAENE, K.; MESSENS, K et al. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v.27, p.12-18, 2010.
- AXELSSON, L. Acid lactic bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., WRIGHT, A.V., OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3 ed. **New York: Marcel Dekker Inc**, p. 1-66, 2004.
- BAKALIS, S.; GIANNAKOUROU, M. C.; TAOUKIS, P. Effect of domestic storage and cooking conditions on the risk distribution in ready to cook meat products. **In 9th international congress on engineering and food (ICEF9)**, Montpellier, p.7–11, 2003.
- BARANYI, J., TAMPLIN, M.L. ComBase: a combined database on microbial responses to food environments. **Journal of Food Protection**, v.67, 1967–1971, 2004.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. **International Journal of food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.
- BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M.L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p. 261–277, 2004.
- BJORKROTH, K.J.; VANDAMME, P.; KORKEALA, H.J. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 3313–3319, 1997.

- BJÖRKROTH, J., HOLZAPFEL, W. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. Springer, New York, NY, USA, pp. 267–319, 2006.
- BJÖRKROTH, K.J., SCHILLINGER, U., GEISEN, R., WEISS, N., HOSTE, B., HOLZAPFEL, W.H., KORKEALA, H.J., VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52, 141–148, 2002.
- BJÖRKROTH, J., DICKS, L.M.T., HOLZAPFEL, W.H. Genus III. *Weissella*. In: De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology** vol. 3. Springer, New York, NY, USA, pp. 643–654, 2009.
- BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M. L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **Int. J. Food Microbiol.** v.33, p.103-120, 1996.
- BUCHANAN, R. L. Predictive food microbiology. **Trends Food Sci. Technol.**, v.4, p. 6–11, 1993a.
- BUCHANAN, R.L. Developing and distributing user-friendly application software. **J. Ind. Microbiol.**, v.12, p.251–255, 1993b.
- BUCHANAN, R.L. Predictive microbiology: mathematical modeling of microbial growth in food. **In Food Safety Assessment**, J.W. Finley, S.F. Robinson, and D.J. Armstrong (Eds.), ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 250–260, 1992.
- BUCHANAN, R.L. Processed meats as a microbial environment. **Food Technol.**, v.40, p. 134–138, 1986.

- BUCHANAN, R.L. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. **Journal of Food Safety**, v.11, 123–134, 1991.
- BUCHANAN, R.L.; KLAWITTER, L.A. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiol.** 9, Relationship between temperature and growth rate of bacterial, p.185–196, 1992.
- BUDDE, B. B.; HORNBAEK, T.; JACOBSEN, T.; BARKHOLT, V.; KOCH, A. G. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.171-184, 2003.
- CAMARGO, A.P.S.S. **Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2015.
- CAYRÉ, M.E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. **Información Tecnológica** [online], v.18, p.23- 29, 2007.
- CHELO, I.M., ZÉ-ZÉ, L., TENREIRO, R. Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. **Microbiology** 156, 420–430, 2010.
- CHOI, H.-J., CHEIGH, C.-I., KIM, S.-B., LEE, J.-C., LEE, D.-W., CHOI, S.-W., PARK, J.-M., PYUN, Y.-R. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52, 507–511, 2002.
- COLLINS, M.D., SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J., WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some *Leuconostoc-like*

organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **J. Appl. Bacteriol.** 75, 595–603, 1993.

COMI, G., IACUMIN, L., MANZANO, M., GIUSTO, C., OTTAVIANI, S., BOSCOLO, D., 2007. Alterazione di prosciutto cotto da *Weissella viridescens*. **Ind. Aliment.** 467, 267–273, 2007.

COMI G.; IACUMIN L. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile offflavour compounds in artisan cooked ham. **Int J Food Sci Tech** v.47, p. 114-121, 2012.

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

DAINTY, R.H.; MACKAY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **J. Appl. Bacteriol.**, v.73, p. S103–S114, 1992.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, p. 190, 2010.

DE BRUYNE, K., CAMU, N., DE VUYST, L., VANDAMME, P., 2010. *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60, 1999–2005, 2010.

DOULGERAKI, A.I., ERCOLINI, D., VILLANI, F., NYCHAS, G.-J.E. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **Int. J. Food Microbiol.** 157, 130–141, 2012.

EGAN, A.F.; SHAY, B.J.; ROGERS, P.J. Factors affecting the production of hydrogen-sulfide by *Lactobacillus sake* L13

growing on vacuum-packaged beef **J. Appl. Bacteriol.**, v.67, p. 255–262, 1998.

ENNAHAR, S., CAI, Y., FUJITA, Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 444–451, 2003.

ERCOLINI, D., PONTONIO, E., FILIPPIS, F. DE, MINERVINI, F., STORIA, A. LA, GOBBETTI, M., CAGNO, R. DI, 2013. Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. **Appl. Environ. Microbiol.** 79, 7827–7836, 2013.

EVANS, J. A; STANTON, J. I; RUSSELL, S. L; JAMES, S. J. Consumer handling of chilled foods: A survey of time and temperature conditions. **MAFF Publications**, London, PB 0682, 1991.

FARAG, H.; KORASHY N.T. Lactic acid and pH as induction for bacteria spoilage of meat and some meat products. **J. Appl. Sci. Res.** ed.2, v.8, p.522-528, 2006.

FERREIRA, L. D. **Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2004. p. 182, 2004.

FU, B.; LABUZA, T. P. Considerations for the Application of Time-Temperature Integrators in Food Distribution. **Journal of Food Distribution Research**, v. 23, p. 9-so18, 1992.

FU, B.; TAOUKIS, P.S.; LABUZA, T.B. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairly products with time–temperature integrators. **J. Food Sci.**, v.56, p. 1209–1215, 1991.

FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S. A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 501-509, 2004.

GANZLE, M.G., EHMANN, M., HAMMES, W.P. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2616-2623, 1998.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M.F.B.; KALSCHNE, D.L.; SARMENTO, C.M.P. Modelagem do crescimento de bactérias lácticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido fatiados e embalados à vácuo. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v.15, n.1, 2013.

GHEBREHEWET, S.; STEVENSON, L. Effectiveness of home-based food storage training: A community development approach. **International Journal of Environmental Health Research**, v.13, p. S169–S174, 2003.

GONZÁLEZ-QUIJANO, G.K., DORANTES-ALVAREZ, L., HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H., JARAMILLO-FLORES, M.E., PEREA-FLORES, M.J., VERA-PONCE DE LEÓN, A., HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. Halotolerance and survival kinetics of lactic acid bacteria isolated from jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) fermentation. **J. Food Sci.** 79, 1545–1553, 2014.

HAN, Y.; JIANG, Y.; XU, X.; SUN, X.; XU, B.; ZHOU, G. Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. **Meat Science**, v.88, p. 682–688, 2011.

HAN, S.-K., HONG, Y., KWAK, H.-L., KIM, E.-S., KIM, M.-J., SHRIVASTAV, A., OH, M.-H., KIM, H.-Y., 2014. Identification of lactic acid bacteria in pork meat and pork meat products using SDS-PAGE, 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry. **J. Food Saf.** 34, 224–232, 2014.

HENK, G.A., CUPPERS, M., OOMES, S., BRUL, S. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3764-3769, 1997.

HERMES, C. J. L. **Uma metodologia para a simulação transiente de refrigeradores domésticos**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2006.

HOLZAPFEL, W., KANDLER, O. Taxonomy of the species *Lactobacillus Beijerinck*. VI. *Lactobacillus coprophilus* subsp. confusus nov. subsp., a new variety of the subspecies *Betabacterium*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 123, 657–666, 1969.

HU, P.; ZHOU, G.; XU, X.; LI, C.; HAN, Y. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. **Food Control**, v. 20, p. 99–104, 2009.

HUANG, L. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters - Determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions. **Journal of Food Science**, v.73, n. 5, p. 235-242, 2008.

HUANG, L. IPMP 2013- a comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, 171, p.100–7, 2014.

HUDSON, J.A. Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. Lett. **Appl. Microbiol.**, v.16, p.274-276, 1993.

JACOBSEN, T.; BUDDE, B. B.; KOCH, A. G. Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. **Journal of Applied Microbiology**, v.95 (2-3), p. 242-249, 2003.

JAMES, S. J. EVANS, J. JAMES, C. A review of the performance of domestic refrigerators. FRPERC, University of Bristol, Churchill Building, Langford, Bristol. **Journal of Food Engineering** 87, 2008.

JAY, J.M., 2000. Processed meats. In: Jay, J.M. (Ed.), *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, pp. 87–99, 2000.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed, p. 711, 2005.

KAMENÍK, J.; DUŠKOVÁ, M.; ŠEDO, O.; SALÁKOVÁ, A.; PAVLÍK, Z.; ZDRÁHAL, Z.; KARPÍŠKOVÁ, R. Lactic acid bacteria in hot smoked dry sausage (non-fermented salami): Thermal resistance of *Weissella viridescens* strains isolated from hot smoked dry sausages. **Food Science and Technology**, v.61, p. 492-495, 2015.

KOORT, J.; MURROS, A.; COENYE, T.; EEROLA, S.; VANDAMME, P.; SUKURA, A.; BJORKROTH, J. *Lactobacillus oligofermentans* sp. nov., associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged poultry products. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p.4400–4406, 2005.

KORKEALA, H. AND BJÖRKROTH, K. J. Spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages: a review. **J. Food Prot.** v.60, p.724-731, 1997.

KOUTSOUMANIS, K. P.; TAOUKIS, P. Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. In: SOFOS, J. N. (Ed.). *Improving the safety of fresh meat*. **Cambridge: Woodhead**, p. 503-561, 2005.

KOUTSOUMANIS, K.; STAMATIOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.J.E. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. **Applied and Environmental Microbiology** [online], v. 72, n. 1, p. 124- 134, 2006.

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

LEBERT, I.; LEBERT, A. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling

approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, p. 968–984, 2006.

LÉONARD, L.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A.; SAUREL, R.; OULAHALA, N. Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* growth: Comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells. **Food Control**, v.37, p. 200–209, 2014.

LI, K.L.; TORRES, J.A. Microbial growth estimation in liquid media exposed to temperature fluctuations. **J. Food Sci.**, v.58, p. 644–648, 1993.

LONGHI, D.A. (2012). **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não isotérmicas**. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LONGHI, D.A.; DALCANTON, F.; ARAGÃO, G.M.F.; BRUNO AUGUSTO MATTAR 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.

LORINCZ, F.; INCZE, K. Greening in cured meats by *L. viridescens*. **Fleischwirtschaft**, v.13, p.406, 1961.

MAGNUSSON, J., JONSSON, H., SCHNÜRER, J., ROOS, S., 2002. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52, 831–834, 2002.

MARKLINDER, I.M.; LINDBLAD, M.; ERIKSSON, L.M.; FINNISON, A.M, LINDQVIST, R. Temperaturas de armazenamento e manuseio Início do consumidor de alimentos refrigerados na Suécia, **Journal of Food Protection**, v.11, p. 2570-2577, 2004.

- MASSAGUER, P. R. D. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2006.
- McDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 1 27, 1999.
- McKELLAR, R. C., LU, X. Modeling Microbial response in Food. **CRC series in contemporary food science**. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2004.
- McMEEKIN, JN OLLEY, T. ROSS, DA Ratkowsky. Predictive microbiology: Theory and application. **Research Studies Press Ltd.**, Taunton, Reino Unido, 1993.
- McMEEKIN, T. A. et al. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 395-407, 2002.
- McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework or change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p. 133-153, 2002.
- McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Shelf life prediction: status and future possibilities. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 33, p. 65-83, 1996.
- McMEEKIN, T.A., ROSS, T., OLLEY, J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. **Int. J. Food Microbiol.**, v.15, p.13–32, 1992.
- McMEEKIN, T.A.; CHANDLER, R.E.; DOE, P.E.; GARLAND, C.D.; OLLEY, L.; PUTRO, S.; RATKOWSKY, D.A. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p. 543–550, 1987.
- McMEEKIN, T.A.; OLLEY, J. Predictive microbiology. **Food Technol.**, (Australia), v.38, p. 331–334, 1986.

- MILBOURNE, K. Thermal Tolerance of *Lactobacillus viridescens* in Ham. **Meat Science**, v.9, p. 113-119, 1983.
- MONTANARI, R. Cold chain tracking: A managerial perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v.19, p. 425-431, 2008.
- NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, D.S.; FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology** [online], v. 3, p.41-51, 2000.
- NIVEN JR, C.F. Symposium on the lactic bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v.16, p. 247, 1952.
- NIVEN JR., C.F., EVANS, J.B. *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. **J. Bacteriol.** 73, 758-759, 1957.
- NIVEN JR., C.F.; CASTELLANI, A.G.; ALLANSON, V. A study of the lactic acid bacteria that cause surface discoloration of sausages. **J. Bacteriol.**, v.58, p. 633, 1949.
- PEIRSON, M.D., GUAN, T.Y., HOLLEY, R.A., 2003. Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discoloration. **Int. J. Food Microbiol.** 86, 223-230, 2003.
- PEXARA, E.S.; METAXOPOULOS, J.; DROSINOS, E.H. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages - piroški - stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10°C. **Meat Science**. v. 62, p. 33-43, 2002.
- PSOMAS, A. N.; NYCHAS, G.; HAROUTOUNIAN, S.A. et al. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. **In Computers and Electronics in Agriculture**, v.76 (1), p.119-129, 2011.
- OH, S.J., SHIN, N.-R., HYUN, D.-W., KIM, P.S., KIM, J.Y., KIM, M.-S., YUN, J.-H., BAE, J.-W. *Weissella diestrammenae* sp. nov.,

isolated from the gut of a camel cricket (*Diestrammena coreana*).
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 2951–2956, 2013.

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.

RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J.; McMEEKIN, T.A.; BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **J. Bacteriol.** 149, p.1–5, 1982.

ROSS, T. Belehradek-type models. **J. Ind. Microbiol.**, v.12, p. 180–189, 1993.

ROSS, T.; DALGAARD, P. Secondary models R.C. McKellar, X. Lu (Eds.), **Modeling Microbial Responses in Foods**, CRC Press, Boca Raton, p. 63–150, 2004.

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.

RUSSO, F., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G., VILLANI, F. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat. **Food Microbiology**, v. 23, p. 797-802, 2006.

SAMELIS, J., MAUROGENAKIS, F., METAXOPOULOS, J. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. **Int. J. Food Microbiol.** 23, 179–196, 1994.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; GEORGIADOU, K.G.; METAXOPOULOS, J. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 649–660, 1998.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of

cooked meats at 4 degrees C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329-340, 2000a.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking **Int. J. Food Microbiol.**, v.56, p. 133-143, 2000b.

SANTOS, E.M.; JAIME, I.; ROVIRA, J.; LYHS, U.; KORKEALA, H.; BJÖRKROTH, J. Characterization and identification of lactic acid bacteria in morcilla de Burgos. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p. 285-296, 2005.

SCANNELL, A. G. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E. K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.241-249, 2000.

SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W.H., BJÖRKROTH, K.J., 2006. Lactic acid bacteria. In: Blackburn, C.d.W. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, pp. 541-578, 2006.

SHARPE, M.E. *Lactobacilli* in meat products. **Food Manufacture**, v.37 (1962), p.582, 1962.

SMITH, M.G. The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. **J. Hygiene Camb.** 64, 298-300, 1985.

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

SOPER, H. E. et al. On the Distribution of the Correlation Coefficient in Small Samples. Appendix II to the Papers of "Student" and R. A. Fisher. **Biometrika**, v. 11, n. 4, p. 328-413, 1917.

- SWINNEN, I. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137-159, 2004.
- TAHIRI, I.; DESBIENS, M.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. **Food Microbiology**, v.26, p.783-793, 2009.
- TAJABADI, N., MARDAN, M., MUSTAFA, S., FEIZABADI, F., NATEGHI, L., RASTI, B., MANAP, M.Y.A. *Weissella* sp. Taj-Apis, a novel lactic acid bacterium isolated from honey. **J. Food Agric. Environ.** 10, 263–267, 2012.
- TAKAHASHI, H.; KIMURA, B.; YOSHIKAWA, M.; GOTOU, S.; WATANABE, I.; FUJII, T. Direct detection and identification of lactic acid bacteria in a food processing plant and in meat products using denaturing gradient gel electrophoresis. **J. Food Prot.**, v.67, p. 2515–2520, 2004.
- TANASUPAWAT, S., SHIDA, O., OKADA, S., KOMAGATA, K. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50, 1479–1485, 2007.
- TAOUKIS, P. S.; GIANNAKOUROU, M. C.; KOUTSOUMANIS, K.; BAKALIS, S. Modelling the effect of house hold chilled storage conditions on the risk distribution in meat products. **In 3rd international symposium on applications of modelling, as an innovative technology in the Agri-Food Chain**, Leuvan, Belgium, 2005.
- TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. **Predictive microbiology in food: today's tools to meet stakeholders' expectations.** Proceedings of the 8th *International Conference on Predictive Modelling in Food*; 2013; Sept 16–20, 978-2-35670-025-4, CNIEL, Paris, France (2013).
- TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison

of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. **Food microbiology**, v.45, p. 290-299, 2015.

- THAPA, N., PAL, J., PRAKASH, J.P. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. **Int. J. Food Microbiol.** 107, 33–38, 2006.
- TOHNO, M., KITAHARA, M., INOUE, H., UEGAKI, R., IRISAWA, T., OHKUMA, M., TAJIMA, K. *Weissella oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grains. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 63, 1417–1420, 2013.
- TREMARIN, A. **Modelagem matemática do crescimento de em suco e maçã solidificado sob condições isotérmicas e não isotérmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, p. 217, 2015.
- TRIAS, R.; BANERAS, E.; BADOSA, L.; MONTESINOS, E. Bioprotection of golden delicious apples and iceberg lettuce against food borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p.50-60, 2008.
- VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 97-105, 2005.
- VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M.; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2901-2909, 1992.
- VASILOPOULOS, C.; RAVYTS, F.; DE MAERE, H.; DE MEY, E.; PAELINCK, H.; DE VUYST, L.; LEROY, F. Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. **J. Appl. Microbiol.**, v.104, p. 1341–1353, 2008.

- VELA, A.I., FERNÁNDEZ, A., DE QUIRÓS, Y.B., HERRÁEZ, P., DOMÍNGUEZ, L., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. *Weissella ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Mesoplodon bidens*). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 61, 2758–2762, 2011.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DE GRAEF, V.; DEBEVERE, J. In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. **J. Appl. Microbiol.**, v.98, p. 33–42, 2005.
- WANG, F., NISHINO, N., 2008. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. **J. Dairy Sci.** 91, 2380–2387, 2008.
- WHITING, R. C. Microbial Modeling in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467,494, 1995.
- WHITING, R.; BUCHANAN, R. A classification of models in predictive microbiology - reply. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175- 177, 1993.
- WRAP, 2013. Impact of More Effective Use of the Fridge and Freezer. Relatório disponível online em: <http://www.wrap.org.uk/content/impact-using-your-fridge-and-freezer-moreeffectively>. Acesso 15 de fevereiro de 2015.
- ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of bacterial-growth with shifts in temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 204-213, 1994.
- ZWIETERING, M.H., CUPPERS, H.G.A.M., DE WIT, J.C., VAN'T RIET, K. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.195-203, 1994a.
- ZWIETERING, M.H., DE KOOS, J.T., HASENACK, B.E., DE WIT, J.C., VANT'T RIET, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.1094–1101, 1991.

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