



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INATIVAÇÃO DE *Weissella viridescens* IN VITRO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Larissa Ventura Ramos

Florianópolis

2017

Larissa Ventura Ramos

INATIVAÇÃO DE *Weissella viridescens* IN VITRO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Gláucia Maria Falcão de Aragão

Co-Orientadora: Msc Cíntia Maia Braga

Florianópolis

2017

LARISSA VENTURA RAMOS

INATIVAÇÃO DE *Weissella viridescens* IN VITRO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Professora Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Presidente da Banca – Orientadora

Msc Cíntia Maia Braga

Membro - Co-Orientadora

Professora Dr^a. Débora de Oliveira

Membro

Dr^a. Andréia Tremarin

Membro

Florianópolis

2017

“Um trabalho te dá um propósito e um significado. A vida é vazia sem ambos.”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À Prof. Gláucia Aragão, pela orientação neste trabalho, por me apresentar a microbiologia preditiva com tamanho brilho no olhar, por tantos ensinamentos e conselhos durante as aulas.

À Cíntia, por tanta paciência e vontade de ensinar, por sempre manter a calma e por me confiar a tarefa de fazer parte do seu trabalho. Não foi por acaso que eu recebi você como Co-Orientadora, poucas pessoas no mundo me entendem como você, poder falar e dividir minhas aflições, sem medir as palavras, foi fundamental. Minha amizade e gratidão serão para sempre.

À Prof. Débora, por aceitar fazer parte da banca examinadora, mas principalmente por transmitir o seu conhecimento de forma tão incrível, nos fazendo ter ainda mais amor por essa profissão.

À Andréia, por aceitar fazer parte da banca examinadora, e por confiar na minha capacidade profissional, mesmo me conhecendo tão pouco. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Telma e Rogério, que torcem por mim incondicionalmente. Agradeço por saberem me guiar, estando sempre ao meu lado, segurando firmemente minha mão sem me deixar cair. O apoio de vocês foi indispensável durante esses cinco anos, obrigada por entenderem minha ansiedade e por sorrir nas dificuldades, confirmando que tudo sempre acaba bem.

Ao Matheus, pela força e incentivo em todos os momentos. Por me fazer acreditar que sempre é possível, e que eu sou capaz. Pelo colo, pela vibração a cada pequena conquista, por todo amor, paciência e dedicação.

A minha grande família, que está ao meu lado em todas as horas, por rezarem, torcerem, incentivarem e por todo amor. Acreditem, sem todos vocês, nada disso seria possível.

RESUMO

Um grande desafio para as indústrias alimentícias é diminuir as perdas por deterioração dos produtos, além disso, existe uma maior preocupação com a qualidade nutritiva dos alimentos, tornando necessário a busca por tratamentos que sejam eficientes na inativação de microrganismos, aumentando a vida útil do produto, e que mantenham as propriedades nutricionais e sensoriais. Em produtos cárneos, a presença de microrganismos deteriorantes pode levar ao aumento de viscosidade, acidificação e manchas verdes. Bactérias ácido lácticas (BAL) são deteriorantes de produtos cárneos curados embalados a vácuo, e a principal espécie de BAL estudada neste trabalho foi a *Weissella viridescens*, um microrganismo anaeróbico facultativo, que pode se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura entre 5°C e 45°C, e possui comportamento estritamente fermentativo, encontrado na superfície destes alimentos. O vácuo e a temperatura de refrigeração, criam um ambiente perfeito para estes microrganismos, além de terem o seu crescimento favorecido pelos sais de cura, presentes na maioria dos embutidos, utilizados para inibir o crescimento de bactérias patogênicas. O tratamento por radiação UV é um método alternativo para a inativação de microrganismos presentes nas superfícies dos alimentos. A radiação UV-C possui comprimentos curtos, na faixa de 200nm a 280nm e atua causando o deslocamento físico de elétrons e a quebra de ligações no DNA das células vegetativas, alterando o seu metabolismo e levando à morte. Foram feitos testes experimentais *in vitro*, utilizando um equipamento com lâmpadas de mercúrio que produzem emissão UV-C, para as condições de 0,579 W/m², 1,006 W/m², 1,342 W/m², 1,627 W/m² e 1,979 W/m². Utilizando os conceitos de microbiologia preditiva, foram definidos os modelos primário, secundário e dinâmico. O modelo primário descreve a cinética de inativação, e o que melhor representou os dados foi o Modelo de Weibull, os fatores Bias e Exatidão foram calculados e indicaram que o modelo possui uma alta capacidade preditiva. O modelo secundário descreve a variação do parâmetro fator de escala (β) com a variação da intensidade de radiação. Foram testados os modelos secundários Linear, Raiz Quadrada, Arrhenius e Exponencial, e o que melhor representou os dados experimentais, com R² igual a 0,96, foi o modelo Exponencial, apresentando Fator Bias e Exatidão igual a 1,010 e 1,121, respectivamente. O modelo dinâmico representa cinética de inativação para *W.viridescens* quando a intensidade de radiação é variável. Este modelo foi definido através da equação de Peleg (2006) baseada no modelo primário de Weibull e resolvido utilizando o software Matlab, onde apresentou uma boa predição, quando simulados para as condições de 0,579W/m² e 1,342W/m². O tratamento por radiação UV-C mostrou-se eficiente para inativação *W.viridescens*, já que permitiu, aproximadamente, seis reduções logarítmicas nos experimentos *in vitro*. Essa condição foi alcançada em alguns segundos, criando a possibilidade deste método ser utilizado na indústria.

Palavras-chave: Inativação. Bactéria Ácido láctica. *Weissella viridescens*. Radiação UV-C. Microbiologia preditiva.

ABSTRACT

A major challenge for the food industry is to reduce losses due to product deterioration; in addition to that, currently there is a greater concern with food nutritional quality, making it necessary a search for treatments that are efficient in inactivating microorganisms, increasing the product shelf life, and that maintain the nutritional and sensory properties. In meat products, deterioration can lead to increased viscosity, acidification and green spots. The main Lactic Acid Bacteria of vacuum-packed cured meat products is *Weissella viridescens*, an optional anaerobic microorganism, which can develop over a wide temperature range between 5°C and 45°C, has a strictly fermentative behavior and is present on the surface those foods. The vacuum and the cooling temperature create a perfect environment for these microorganisms, in addition to their growth being favored by the curing salts, present in most sausages, used to inhibit the growth of pathogenic bacteria. UV light treatment is an alternative method for the inactivation of microorganisms present on food surfaces. UV-C light has short lengths, ranging between 200nm to 280nm and acts by inducing the physical displacement of electrons and breaking the DNA bonds of vegetative cells, altering their metabolism and leading them to death. Experimental tests were carried out *in vitro* using an equipment with mercury lamps that produce UV emission, in the conditions of 2, 4, 6, 8 and 10 lamps. Using the concepts of predictive microbiology, primary, secondary and dynamic models were defined. The primary model describes the kinetics of inactivation, and the best represented the data was the Weibull Model. The Bias and Accuracy factors were calculated for 2, 4, 6, 8 and 10 lamps and indicated that the model has a high predictive capacity. The secondary model describes the variation of the scale factor parameter (β) with the variation of the radiation intensity. Linear, Square root, Arrhenius and Exponential secondary models were tested, and the one that represented best the experimental data, with R^2 equal to 0.96, was the Exponential model, with Bias Factor and Accuracy equal to 1.010 and 1.121, respectively. The dynamic model represents kinetics of inactivation for *W.viridescens* when the intensity of radiation is variable. This model was defined through the Peleg equation (2006) based on the Weibull primary model and solved using the Matlab software, where it presented a good fit to the experimental data when simulated for the conditions of 2 and 6 lamps. The treatment by UV light was efficient for inactivation *W.viridescens*, since it allowed approximately six log reductions in the *in vitro* experiments. This condition was reached in a few seconds, creating the possibility of this method being used in the industry.

Keywords: Inactivation. Lactic acid Bacteria. *Weissella viridescens*. UV-C light. Predictive microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espectro eletromagnético	15
Figura 2 - Representação da radiação UV no DNA dos microrganismos.....	16
Figura 3 - Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull para diferentes valores de α	19
Figura 6 - Aparato Experimental para processamento não térmico de alimentos.....	22
Figura 7 - Disposição das lâmpadas para os experimentos com 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas	23
Figura 8- Radiômetro	25
Figura 4 – Inóculo gotejado em forma de círculo	26
Figura 5 – Fluxograma ilustrativo do processo experimental para inativação de <i>W. videscens</i> ...	26
Figura 9 - Curvas de Radiação	29
Figura 10 – Cinética de inativação para <i>W. Viridescens</i>	31
Figura 11 – Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	33
Figura 12 – Ajuste do modelo secundário Raiz Quadrada para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	33
Figura 13- Ajuste do modelo secundário Linear para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	34
Figura 14 – Ajuste do modelo secundário Exponencial para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	34
Figura 15 – Simulação da Variação da intensidade de radiação com o tempo	35
Figura 16 – Cinética de inativação de <i>W. viridescens</i> em função do tempo em condições variáveis de radiação. Os dados referentes à inativação nas condições constantes de intensidade de 0,579 W/m ² e 1,342W/m ² foram acrescentadas com o objetivo de comparação dos resultados em condições variáveis e constantes	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos secundários avaliados para descrever a influência da intensidade de radiação nos parâmetros primários de inativação de <i>W. viridescens</i>	27
Tabela 2 - Valores de intensidade de radiação para 2, 4, 6, 8 e 10 Lâmpadas.....	30
Tabela 3 - Análise Estatística do ajuste dos modelos primários Log-Linear e Weibull aos dados experimentais das curvas de inativação de <i>W. viridescens</i> sob diferentes intensidades de radiação	30
Tabela 4 - Valores dos parâmetros α e β para os modelos de Weibull (com 2 parâmetros) e Weibull com α fixo e análise estatísticas do ajuste para cada modelo.....	31
Tabela 5 - Análise estatística para o modelo primário Weibull com α fixo.....	32
Tabela 6 - Análise estatística para a escolha do modelo secundário.....	34

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA	11
1.2.1 Objetivo Geral	11
1.2.2 Objetivos Específicos	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 DEGRADAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS	12
2.2 BAL	13
2.3 MÉTODOS DE INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM PRODUTOS CÁRNEOS	14
2.3.1 Tecnologia de luz ultravioleta	15
2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	16
2.4.1 Modelos Matemáticos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 MICRORGANISMO	21
3.2 PREPARAÇÃO DO PRÉ INÓCULO	22
3.3 OBTENÇÃO DA CURVA DE INATIVAÇÃO	25
3.3.1 Modelo Primário	Erro! Indicador não definido.
3.3.2 Modelo Dinâmico	Erro! Indicador não definido.
3.4 EQUIPAMENTO DE RADIAÇÃO	22
3.4.1 Intensidade de luz aplicada para inativação	24
3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA	26
3.5.1 Modelo primário	26
3.5.2 Modelo secundário	27
3.5.3 Modelo dinâmico	27
3.5.4 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 INTENSIDADE DE RADIAÇÃO	29
4.2 DEFINIÇÃO DO MODELO PRIMÁRIO	30
4.3 DEFINIÇÃO DO MODELO SECUNDÁRIO	32
4.4 DEFINIÇÃO DO MODELO DINÂMICO	35
4 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

É crescente a busca por alimentos de qualidade, que tenham valor nutritivo e sejam seguros, desafiando as indústrias a encontrarem métodos que sejam eficientes em seus processos obtendo produtos finais com maior vida útil e que agradem o consumidor.

Em geral, produtos cárneos, como presuntos e salsichas, são submetidos ao tratamento térmico com aquecimento moderado com objetivo de inativar microrganismos patogênicos e deteriorantes. Como estes produtos alcançam temperaturas entre 58°C e 75°C, apenas parte dos microrganismos são destruídos e, após o tratamento, a refrigeração e o vácuo produzido nas embalagens cria o ambiente perfeito para o crescimento de microrganismos deteriorantes (ROÇA, 2000).

Bactérias ácido lácticas (BAL) são microrganismos deteriorantes, resistentes ao tratamento térmico moderado, que 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 (SLONGO, 2008; MARTINS, 2015). Dentre as diversas espécies de BAL, a *Weissella viridescens* está presente, principalmente, em produtos cárneos embalados a vácuo e resfriados, já que este é o ambiente favorável para o seu crescimento.

A utilização da tecnologia ultravioleta na indústria de alimentos é uma alternativa aos métodos tradicionais de inativação microbiana, como o uso do calor. O tratamento com radiação UV-C, processo a seco e a frio, é simples e tem se demonstrado eficaz. Geralmente é utilizado para reduzir a carga microbiana em superfícies, como é o caso das BAL, já que a luz UV-C possui baixo grau de penetração (GUEDES et al., 2009).

A busca por técnicas que permitam prever e monitorar a deterioração dos alimentos, com a intenção de estimar a vida útil dos mesmos é crescente nas indústrias. A microbiologia preditiva é uma ferramenta que vem sendo muito utilizada para a determinação da vida útil dos alimentos, através do uso de equações matemáticas que descrevem a cinética microbiana tanto para o crescimento, quanto para a inativação.

1.1 JUSTIFICATIVA

O método de inativação de microrganismos por radiação UV é uma alternativa aos tratamentos térmicos que são os principais responsáveis pela degradação de nutrientes em alimentos. Com o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam esta inativação, é possível prever comportamentos e determinar parâmetros úteis para a indústria.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar e modelar a cinética de inativação de *W.viridescens*, *in vitro*, quando submetida ao tratamento por radiação UV-C.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a eficiência da aplicação de luz UV na inativação de *W. viridescens*, e obter parâmetros através do ajuste do modelo primário aos dados experimentais, em determinadas intensidades de radiação;
- Definir um modelo secundário, que descreva a influência da intensidade de luz UV sobre os parâmetros primários de inativação de *W. viridescens*.
- Obter um modelo matemático dinâmico que descreva a inativação de *W. viridescens* em função do tempo em condições de variação de radiação.
- Validar o modelo dinâmico obtido com a realização de tratamentos do inóculo sob variação de intensidade de radiação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEGRADAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Os produtos cárneos são facilmente contaminados por microrganismos durante a manipulação e o processamento. A carne é considerada um excelente meio para o crescimento de microrganismos, pois apresenta fatores intrínsecos que favorecem o crescimento microbiano. Sendo alguns destes: alta atividade de água; pH favorável para a maioria dos microrganismos e elevado teor de nutrientes. Além disso, não possui constituintes antimicrobianos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A maioria dos produtos cárneos é embalado a vácuo, ou seja, sem a presença de oxigênio, com a intenção de inibir reações de oxidação e o crescimento de microrganismos deteriorantes, como por exemplo as *Pseudomonas*, aumentando assim a sua vida útil. No entanto, este meio torna-se favorável ao crescimento de alguns microrganismos anaeróbios, ou aeróbios facultativos deteriorantes. Quando submetidos à refrigeração, a BAL tem uma vantagem considerável na velocidade de crescimento comparada com os aeróbios facultativos e as bactérias gram-negativas. (SÄDE, 2011; ALCANTARA et al, 2012).

A deterioração de produtos cárneos ocorre normalmente de três formas: aumento da viscosidade, acidificação e aparecimento de manchas verdes. A deterioração viscosa ocorre na parte externa do produto, sendo que leveduras e BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* e *Brochothrix thermosphacta* podem ser encontradas nesse material. A acidificação é resultado da utilização de lactose e outros açúcares por microrganismos como *Lactobacillus* e *Enterococcus*, produzindo ácidos. As manchas verdes em carnes processadas são causadas pela presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser produzido quando o produto entra em contato com o ar, ou pelo acúmulo devido ao crescimento de microrganismos como *Weissella viridescens*, *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus jensenii* (FRANCO & 8 LANDGRAF, 2008)

Os produtos cárneos, como por exemplo embutidos, geralmente passam pelo processo térmico para inativação de microrganismos. Aqueles que sobrevivem ao processo térmico são controlados pela utilização de sais de cura, estes auxiliam na inibição de microrganismos anaeróbios, porém podem favorecer o crescimento de outras bactérias gram positivas, como as bactérias lácticas, bolores e leveduras. Bactérias lácticas acabam tornando-se dominantes nestes produtos por serem relativamente insensíveis aos nitritos (GOMES, 2007; JAY, 2005).

2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

BAL são microrganismos que se apresentam na forma de cocos ou bacilos. São classificadas como Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativas, microaerófilas e anaeróbicas facultativas. São geralmente mesófilas, com temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 35°C, no entanto conseguem se desenvolver numa ampla faixa de temperatura entre 5°C e 45°C (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; AXELSSON, 2004; MASSAGUER, 2006). Em geral, estas bactérias toleram baixos valores de pH e possuem metabolismo estritamente fermentativo. São classificadas como homofermentativas, quando o produto da sua fermentação é apenas ácido láctico, e heterofermentativas, quando produzem ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e etanol (LYHS, 2002; JAY, 2005; MASSAGUER, 2006).

Este grupo de bactérias inclui os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY, 2005).

As BAL estão presentes em pequenas quantidades na microbiota natural de alimentos como carnes, vegetais, leite, produtos lácteos, molhos para saladas, frutos do mar entre outros. Entre as BAL, o gênero *Weissella*, foi escrito 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*. Estes microrganismos estão associados a processos de deterioração em produtos à base de carne, como a presença de limo, odores e sabores desagradáveis, perda de vácuo, inchaço dos pacotes, descoloração e diminuição do pH (BJÖRKROTH E HOLZAPFEL, DE 2006; COMI E IACUMIN, 2012; SAMELIS ET AL, 1994, 2000A, B).

A *W. 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).

2.3 MÉTODOS DE INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM PRODUTOS CÁRNEOS

Por serem ricos em nutrientes e possuírem alta umidade, os produtos cárneos são um ambiente propício à proliferação de microrganismos. Para garantir a segurança e integridade desses produtos são utilizados alguns métodos de inativação de microrganismos. Os principais métodos de conservação são: tratamento térmico, salga, defumação, aditivos e radiações.

O tratamento térmico pode ser aplicado por meio da pasteurização ou pela esterilização. Na pasteurização, o alimento é submetido a um aquecimento moderado, podendo alcançar as temperaturas de 58°C a 75°C, inativando uma boa parcela dos microrganismos presentes. Já que a inativação não é total, é importante que o produto, depois de pasteurizado, seja mantido sob refrigeração. Na esterilização, o aquecimento geralmente é feito com temperaturas acima de 100°C, deixando os produtos comercialmente estéreis. Este método normalmente é aplicado em produtos enlatados, levando a produtos mais estáveis, que não precisam de refrigeração (ROÇA, 2000).

Tendo em vista que, ao se aplicar calor as características sensoriais e nutritivas são alteradas, reduzindo a qualidade do alimento, métodos alternativos podem ser utilizados. O processo de alta pressão hidrostática (APH) é um método alternativo, que consiste em submeter o alimento à pressurização, em um espaço confinado, a partir de um fluido que atua como meio de transferência de pressão. A pressão é igualmente aplicada em todas as direções, permitindo que o produto mantenha o seu formato original. No processo de APH, alimentos líquidos ou sólidos são submetidos a pressões acima de 100MPa. Em sistemas comerciais as pressões ficam em torno de 400MPa e 700MPa. A aplicação de alta pressão pode causar danos à fisiologia microbiana e sua viabilidade, tanto danificando as células como inativando-as. Assim, exercem efeito direto sobre a segurança dos alimentos, podendo prolongar a sua vida útil (TORREZAN, 2003).

Outro método alternativo é a radiação, utilizado para satisfazer quatro objetivos principais: esterilização, pasteurização, desinfecção e inibição de germinação. Existem várias formas de energia radiante, emitidas de várias maneiras, com comprimentos de onda, frequência e força de penetração diversas, que atuam de formas diferentes sobre o sistema biológico. As radiações ionizantes possuem alta frequência e incluem as radiações alfa, beta, e gama, raios X e nêutrons. Os raios alfa são átomos de hélio sem dois elétrons, com baixo poder de penetração. Os raios betas são mais penetrantes que os raios alfa, porém os raios X possuem o maior poder de penetração (GAVA, 1984). As radiações não ionizantes, entre os raios X e a luz visível, incluem a luz

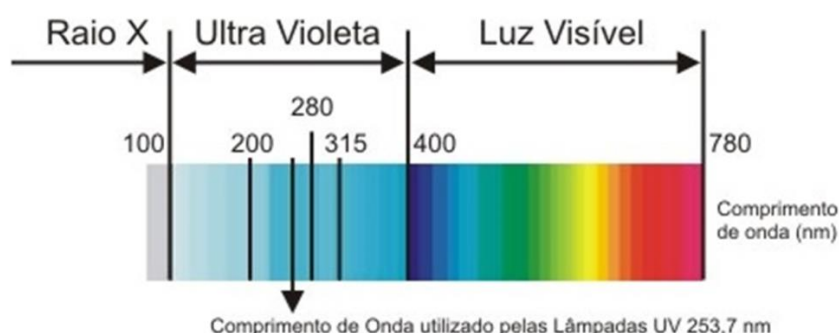
ultravioleta, que tem sido bastante estudada por sua eficiência na inativação microbiológica em água e superfície de diversos materiais (GUEDES et al, 2009).

2.3.1 Tecnologia de luz ultravioleta

A radiação ultravioleta foi descoberta em 1801 pelo cientista alemão Johan Ritter, que percebeu uma forma invisível de luz, além do violeta capaz de oxidar haletos de prata, chamada de luz ultravioleta no fim do século XIX.

A luz (UV) ocupa uma ampla faixa de comprimentos de onda, numa região não ionizante do espectro eletromagnético entre os raios-x (100 nm) e a luz visível (400 nm). Ela pode ser subdividida em três regiões: UV-C, com comprimentos de onda curtos, na faixa entre 200nm e 280 nm; UV-B, com comprimentos de onda médios, na faixa entre 280nm e 315 nm; e UV-A, com comprimentos de onda longos, na faixa entre 315nm e 400 nm, representados na Figura 1 (GUEDES et al, 2009).

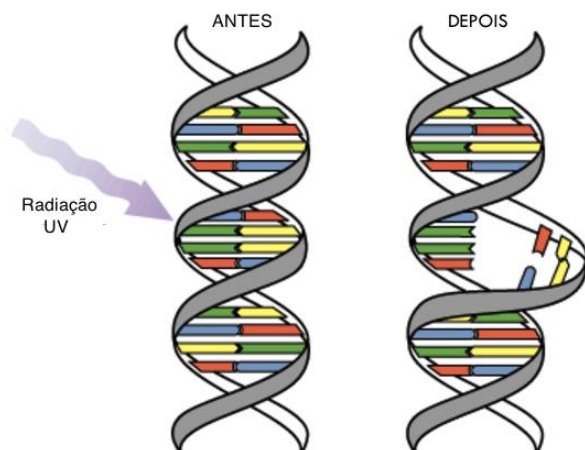
Figura 1- Espectro eletromagnético



FONTE: [http:// www.naturaltec.com.br/Desinfeccao-Ultravioleta-UV-Agua.html](http://www.naturaltec.com.br/Desinfeccao-Ultravioleta-UV-Agua.html)

O efeito germicida da radiação ultravioleta foi detectado pela primeira vez em 1878, mas as primeiras unidades de processamento foram construídas em 1955 na Suíça e na Áustria (AGUIAR et al., 2002). No comprimento de onda germicida (200 a 280nm), a radiação UV-C é suficiente para causar deslocamento físico de elétrons e quebra de ligações no ácido desoxirribonucleico (DNA) dos microrganismos, exemplificado na Figura 2. Isso altera seu metabolismo e reprodução, ou seja, a injúria aos sistemas de reprodução das células as levam à morte (GUERRERO-BELTRÁN e BARBOSA-CÁNOVAS, 2004). Como a composição de DNA varia entre espécies, considera-se que o pico de absorção de UV-C encontra-se na faixa de 260 a 265nm (GUEDES et al, 2009).

Figura 2 - Representação da radiação UV no DNA dos microrganismos



FONTE: <http://www.rafaelgontijo.com.br/radiacao.html>

A fonte natural de luz UV-C vem do sol, e é completamente absorvida nas atmosferas superior e média pelo ozônio e oxigênio molecular. É importante para o controle do crescimento da maioria dos microrganismos, exceto para bactérias fotossintéticas. As fontes artificiais são chamadas de lâmpadas UV de onda curta, que são lâmpadas de mercúrio projetadas para produzir energia na região germicida (254nm), podendo ser de vidro ou quartzo.

O mecanismo de funcionamento ocorre a partir do momento em que se aplica uma diferença de potencial através da lâmpada, gerando campo elétrico no seu interior, que ioniza o vapor de mercúrio, os quais produzem emissão de UV-C, que atinge os microrganismos que estão localizados no ar ou no líquido em volta da lâmpada (LUCAS, 2003).

2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

O crescimento, a sobrevivência e inativação dos microrganismos nos alimentos é determinado pelas propriedades dos alimentos e pelas condições de estocagem. A microbiologia preditiva, reúne os conhecimentos da engenharia, microbiologia e estatística para prever o comportamento microbiológico, baseada na hipótese de que o efeito dessas propriedades pode ser previsto por meio de modelos matemáticos. (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000; SARMENTO, 2006).

Os modelos matemáticos podem ser usados para avaliar a população microbiana com o tempo, avaliar como os efeitos de fatores intrínsecos (como atividade de água e pH) e de fatores extrínsecos (como temperatura, umidade relativa e atmosfera), afetam a velocidade de crescimento ou inativação. Tem como objetivo fornecer informações importantes na tomada de decisão, na

análise de risco, na segurança e qualidade dos alimentos, na avaliação da vida de útil, bem como, no desenvolvimento de novos produtos ou processos. (DANNENHAUER, 2010; SARMENTO, 2006).

A microbiologia preditiva tem sido considerada sob os aspectos probabilístico e cinético, gerando os modelos probabilísticos e cinéticos, respectivamente (ROSS, McMEEKIN, 1994). Os modelos probabilísticos têm o objetivo de prever a probabilidade de algum evento, como por exemplo a germinação de esporos, ou formação de toxinas em determinado tempo. Os modelos cinéticos são baseados no comportamento da população microbiana, velocidade de crescimento ou destruição dos microrganismos, em função do tempo. (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000). Pode-se considerar que os modelos matemáticos estabelecidos para a microbiologia preditiva possuem três níveis: primeiro nível, segundo nível e terceiro nível (WHITING, BUCHANAN, 1993).

O modelo primário descreve a resposta do microrganismo com o tempo para um conjunto único de condições. Cada curva, concentração de metabólito *versus* tempo, pode ser descrita por um conjunto de valores específicos dos parâmetros nos modelos. São considerados primários, modelos que descrevem o crescimento isotérmico e padrões de inativação, pois são derivados diretamente de dados experimentais. Os modelos secundários descrevem as variações de parâmetros dos modelos primários, com a variação de uma condição ambiental. Os modelos terciários combinam os modelos primários e secundários, ou seja, utilizam algoritmos para calcular mudanças nas condições, comparar comportamento microbiano sob diferentes condições, ou graficar o crescimento de vários microrganismos simultaneamente (DANNENHAUER, 2010).

2.4.1 Modelos Matemáticos

2.4.1.1 Modelos Primários

Modelos primários descrevem a mudança do número de microrganismos ao longo do tempo, sob determinadas condições, desde que estas permaneçam estáveis durante o período de estudo. Os modelos primários que descrevem a inativação microbiana são representados pelo modelo linear clássico e por modelos não lineares como Log-linear, Bifásico e Weibull.

2.4.1.1.1 Modelo Log-linear

O modelo Log-linear assume que todas as células e esporos na população têm a mesma resposta a um dado tratamento letal e que sua cinética de inativação é descrita por uma cinética de primeira ordem (SCHAFFNER e LABUZA, 1997). A velocidade de inativação do número de microrganismos pode ser descrita como uma reação de 1ª ordem, como (Equação 2.1):

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (2.1)$$

onde k é a constante de reação e N é a concentração de microrganismos.

Considerando-se as condições iniciais como: $t_0=0$ e $N=N_0$, e integrando dentro de um determinado intervalo de tempo (0 a t), no qual foi aplicado o tratamento em condições constantes, tem-se a Equação 2.2.

$$\ln N - \ln N_0 = -kt \quad (2.2)$$

Na forma exponencial, a Equação 2.2 pode ser escrita pela Equação 2.3:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kt} \quad (2.3)$$

ou seja: a destruição de microrganismos ocorre de forma exponencial.

Aplicando-se logaritmo decimal (Equação 2.4):

$$\log \frac{N}{N_0} = \frac{-kt}{2,303} \quad (2.4)$$

O parâmetro D é definido, em termobacteriologia, como o tempo de redução decimal e está descrito na Equação 2.5:

$$\frac{k}{2,303} = \frac{1}{D} \quad (2.5)$$

D : tempo, em condições ambientais constantes, necessário para a inativação de 90% do número de microrganismos.

Substituindo a equação 2.5 na equação 2.4, encontra-se a equação de Ralm, que descreve a curva de sobreviventes (Equação 2.6):

$$\log \frac{N}{N_0} = \frac{-t}{D} \quad (2.6)$$

2.4.1.1.2 Modelo de Weibull

O modelo de Weibull foi proposto por Waloddi Weibull em 1936 e apresenta, além de simplicidade matemática, uma ótima flexibilidade. Esta função foi inicialmente formulada em 1933 para a modelagem de redução do tamanho de formas, conhecida como distribuição de Rosin-Rammler (PELEG,2006).

O modelo de Weibull, para curvas de sobrevivências não log lineares, está representado na equação 2.7.

$$\log\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{\beta}\right)^\alpha \quad (2.7)$$

onde:

N é o número de microrganismos no instante t ;

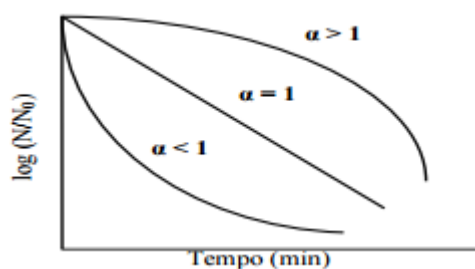
N_0 é o número de microrganismos no tempo inicial;

α é o fator de forma;

β é o fator de escala ou a dose característica de irradiação, e pode ser definido como “o tempo para uma redução decimal” se $\alpha=1$.

No modelo de Weibull, a direção da concavidade da curva de sobreviventes é uma manifestação das diferentes formas de inativação dos microrganismos (Figura 3). Curvas com concavidades voltadas para baixo ($\alpha > 1$) retratam uma população que progressivamente diminui, e o tempo necessário para destruir a mesma fração de microrganismos diminui com o passar do tempo. Concavidades voltadas para cima ($\alpha < 1$), formando uma cauda indicam que a população de microrganismos contém membros que morrem rapidamente. Porém, à medida que o processo de destruição ocorre, os sobreviventes são os mais resistentes, levando a um tempo maior de inativação (PELEG, 2006; ARAGAO et al., 2007).

Figura 3 - Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull para diferentes valores de α



Fonte: Haberbeck, 2011

2.4.1.2 Modelos secundários

Descrevem como os parâmetros cinéticos dos modelos primários variam com as condições ambientais, como temperatura, pH, atividade de água, intensidade de radiação, entre outros (CORRADINI e PELEG, 2005). Os principais modelos secundários apresentados na literatura são os modelos de Arrhenius, o Modelo da Raiz Quadrada e equações exponenciais.

2.4.1.3 Modelos para condições ambientais variáveis (dinâmicos)

Inúmeros fatores ambientais podem causar alterações na cinética microbiana, sendo que a temperatura é considerada um dos fatores ambientais mais importantes no que diz respeito à avaliação do crescimento microbiano (CAMARGO, 2015). Muitos modelos são desenvolvidos e validados sob condições de temperaturas constantes, no entanto, na prática as variações de temperatura ocorrem frequentemente, principalmente durante a estocagem e a distribuição de alimentos.

Baseando-se nos modelos primários e nos modelos secundários é possível estabelecer um modelo dinâmico, considerando o efeito das mudanças das variáveis externas sob o crescimento ou a inativação microbiana, usado na predição de vida útil, sob condições reais. (DANNENHAUER, 2010; CAMARGO, 2015).

A inativação microbiana em condições variáveis pode ser representada pelo modelo de Peleg (2006), que foi baseado no modelo primário de inativação de Weibull, podendo ser utilizado para processos térmicos e não térmicos, tais como aplicação de alta pressão, irradiação ou exposição a um agente químico (PELEG; NORMAND, 2004).

O modelo primário de Weibull é reescrito por Peleg conforme a equação 2.8.

$$\log S(t) = -b(T)t^{\alpha(T)} \quad (2.8)$$

Onde $S(t)$, razão de sobrevivência momentânea, é igual a $N(t)/N_0$; $b(T)$ é o parâmetro do modelo igual a $1/\beta(T)^\alpha$; α é o fator de forma; β é o fator de escala, t é o tempo, e T é a temperatura.

A velocidade de inativação logarítmica, para condições constantes, é dada pela derivação da equação 2.8, resultando na Equação 2.9.

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b(T)\alpha(T)t^{\alpha(T)-1} \quad (2.9)$$

De acordo com Peleg (2006), o tempo que corresponde a qualquer dada velocidade de sobrevivência é chamado de t^* , este foi obtido a partir do isolamento de t da Equação 2.8, e expresso pela Equação 2.10.

$$t^* = \left(\frac{-\log S(t)}{b(T)} \right)^{\frac{1}{\alpha(T)}} \quad (2.10)$$

Ao substituir a Equação 2.10 na Equação 2.09, a equação diferencial ordinária (EDO) dinâmica é obtida, representada pela Equação 2.11. Os modelos empíricos que descrevem $b(T)$ e $\alpha(T)$, são combinados com o perfil de temperatura variável $T(t)$ para produzir os termos $b(T(t))$ e $\alpha(T(t))$.

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b[T(t)]\alpha[T(t)] \left\{ \frac{-\log S(t)}{b[T(t)]} \right\}^{\frac{\alpha[T(t)]-1}{\alpha[T(t)]}} \quad (2.11)$$

A equação 2.11 pode ser resolvida pelo software Matlab, sendo possível prever a inativação microbiana com o tempo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo estudado, bactéria ácido láctica *W. viridescens* (CCT 5843 ATCC 12706, Lote 22.07), foi adquirido na Fundação Tropical de Cultura André Tosello (Campinas, Brasil) e estocado no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

A cepa foi reidratada, conforme indicação, e cultivada em meio de cultivo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e estocada em micro tubos de polipropileno com meio MRS contendo 20% de glicerol a -24°C (MARTINS, 2015; CAMARGO, 2015).

3.2 PREPARAÇÃO DO PRÉ INÓCULO

O pré inóculo foi preparado com meio de cultivo MRS, em Erlenmeyer de 250 ml, com volume útil de 160 ml. A cepa, estocada em micro tubos de polipropileno com meio MRS contendo 20% de glicerol a -24°C, foi descongelada e inoculada no meio.

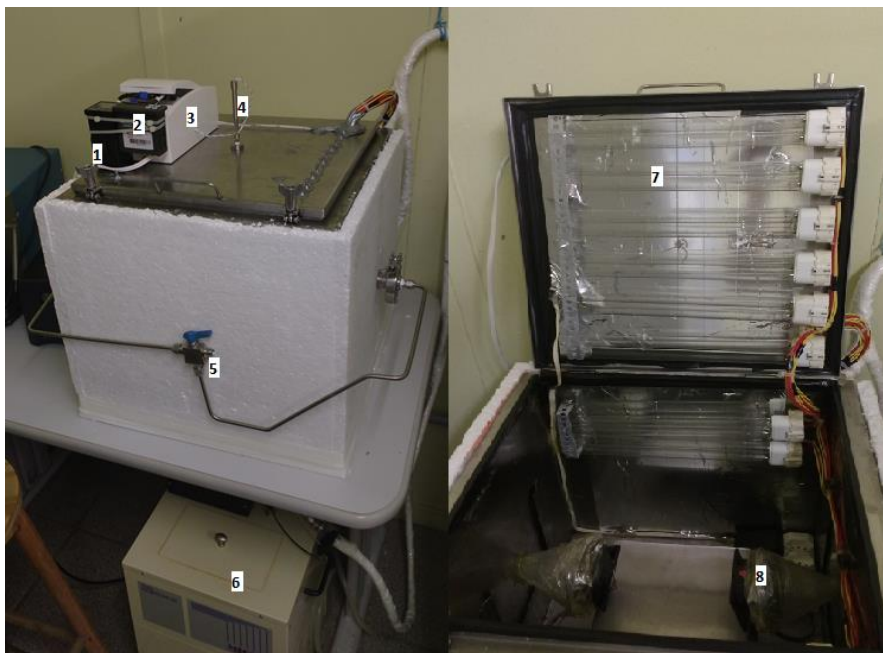
O período de incubação, em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), foi de 18 horas a 30°C, tempo necessário para que a bactéria atinja a fase estacionária e apresente uma concentração de 10^9 UFC/mL (CAMARGO, 2015).

3.3 EQUIPAMENTO DE RADIAÇÃO

O aparato experimental utilizado para gerar radiação UV-C a partir de lâmpadas fluorescentes de mercúrio, é encamisado e possui sistema de refrigeração, que mantém o fluido refrigerante (solução de etilenoglicol) na temperatura ideal, evitando que a temperatura dentro da caixa de metal seja maior que a ambiente, já que temperaturas maiores podem inativar os microrganismos estudados, dessa forma é possível garantir que a inativação seja feita somente através de irradiação.

As amostras, presentes na placa de Petri, são dispostas em um aparador fixado no meio do equipamento, para que recebam a irradiação de forma uniforme, e com distância de 30cm das lâmpadas. O equipamento deve ser ligado 30 minutos antes do experimento, para aquecer as lâmpadas. A Figura 6 mostra a imagem real do equipamento.

Figura 4 - Aparato Experimental para processamento não térmico de alimentos

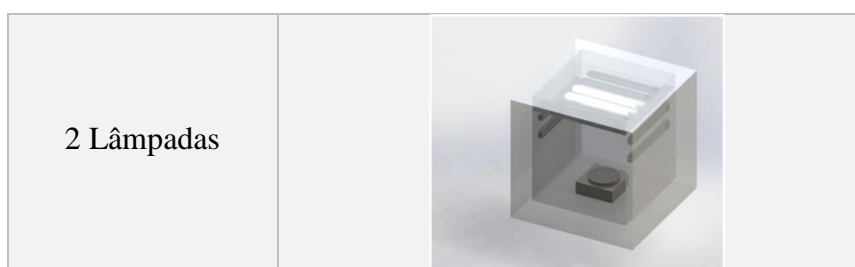


Nota: 1) Indicador de temperatura (Digimec – BTC 9090); 2) Temporizador eletrônico digital microprocessado (TT-34); 3) Caixa de disjuntores; 4) Termopar tipo j (Salcas); 5) Válvula de duas vias (Hoke); 6) Banho termostático (microquímica); 7) Lâmpada fluorescente Germicida UV-C (Osram – 24W, 2G11); 8) Cooler (Intel).

Os itens 1 e 4 da Figura 5 servem para monitorar a temperatura dentro da câmara; item 3, fonte de energia para as lâmpadas e demais dispositivos de medida e controle na caixa; item 2, temporizador cíclico utilizado para emitir luz pulsada com intervalo de até 0,1 s (entre ON-OFF); item 5, válvula de duas vias utilizada para coleta de gases do interior da caixa; item 6, banho termostático utilizado para controlar a temperatura no interior da caixa; item 7, lâmpadas germicidas com espectro de 254 nm; Item 8, *cooler* utilizado para circulação dos gases do interior da caixa até o ponto de coleta (item 5).

A Figura 7 indica a disposição das lâmpadas usada para os experimentos com 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas.

Figura 5 - Disposição das lâmpadas para os experimentos com 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas



4 Lâmpadas			
6 Lâmpadas			
8 Lâmpadas			
10 Lâmpadas			

3.3.1 Intensidade de luz aplicada para inativação

As doses de radiação, ou quantidade de radiação (mJ/cm^2) no tempo aplicado, foram medidas por um radiômetro (Figura 8) colocado dentro do equipamento. Foram avaliados tempos de 1 a 10 minutos para cada condição realizada (2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas).

Figura 6- Radiômetro



3.4 OBTENÇÃO DA CURVA DE INATIVAÇÃO

Primeiramente, foi verificado em espectrofotômetro a absorvância do pré inóculo, com a intenção de conferir se este se encontrava na fase estacionária. Para leitura da absorvância foi necessário diluir 0,2mL de pré inóculo em 1,8 mL de água, com um comprimento de onda de 600nm. A absorvância que indica a concentração de 10^9 UFC/mL é superior ou igual a 0,380. Em seguida, 1 mL de pré inóculo foi diluído em 9,0 mL de água peptonada, para a obtenção de um inóculo com a concentração de 10^8 UFC/mL.

Foi retirada uma alíquota de 0,1mL de inóculo e gotejada, formando um círculo, em placa de Petri (SALOMÃO,2009), exemplificado na Figura 4. A placa foi colocada no equipamento de radiação (Figura 6), e após passar pelo tratamento de radiação UV-C foi adicionado 9,9 mL de água peptonada. A partir deste, diluições sucessivas foram realizadas em tubos de ensaio, de acordo com a necessidade de cada experimento (TREMARIN,2009).

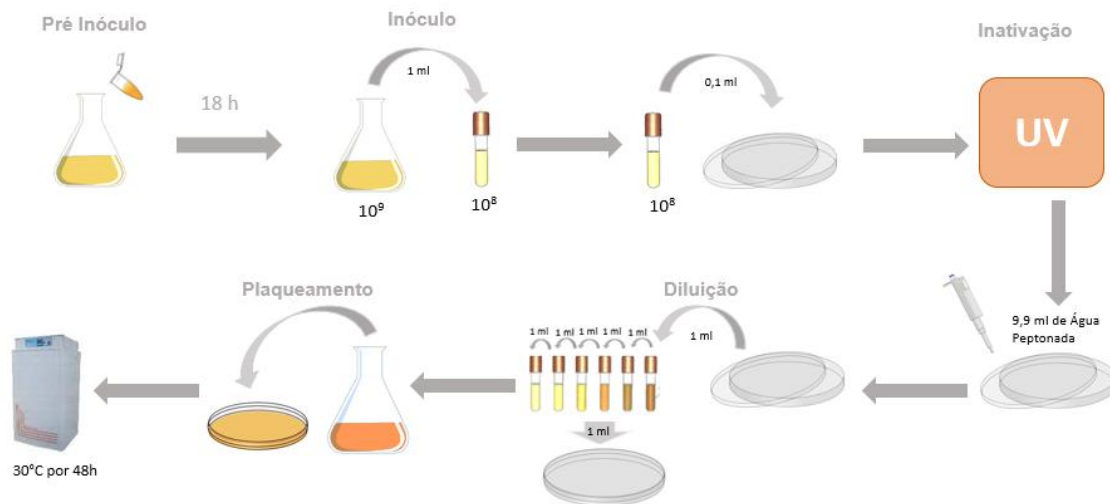
Foram feitos cinco experimentos, cada um com uma intensidade de radiação para 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas. O inóculo *in vitro* foi submetido à radiação UV-C durante alguns segundos, determinados a partir da necessidade de cada processo experimental.

No plaqueamento, foi utilizado ágar MRS com dupla camada, em placas de Petri estéreis e descartáveis. As placas foram incubadas em estufa BOD a 30°C por 48 horas. Os experimentos foram feitos em duplicata (exceto para diluições do controle, para esta os experimentos foram em triplicata) obtendo-se dois dados de crescimento em cada ponto de coleta. Foi feita a contagem de placas com colônias desenvolvidas em números de 25 a 250, e os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de amostra. A Figura 5 demonstra, em forma de fluxograma, o experimento realizado.

Figura 7 – Inóculo gotejado em forma de círculo



Figura 8 – Fluxograma ilustrativo do processo experimental para inativação de *W. videscens*



3.5 MODELAGEM MATEMÁTICA

3.5.1 Modelo primário

Para a escolha do melhor modelo primário, que descreva a inativação de bactéria láctica *W. viridescens*, foi utilizado o suplemento GInaFIT[®] do *software* Excel (Microsoft[®]). Foram testados dois modelos primários, Log-linear e Weibull. O fator de forma, parâmetro alfa (α), do modelo primário escolhido foi calculado para as condições de 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas

3.5.2 Modelo secundário

A partir do parâmetro de fator de escala (β), obtido através do modelo primário, quatro equações correspondentes aos modelos secundários, dispostos na tabela 1, foram comparadas para a seleção do modelo que melhor descreva a influência da variação de intensidade de luz sobre este parâmetro. Os modelos foram ajustados aos dados, usando o *software* Excel (Microsoft®), bem como o cálculo de R^2 , utilizado para definir o melhor ajuste.

Tabela 1 - Modelos secundários avaliados para descrever a influência da intensidade de radiação nos parâmetros primários de inativação de *W. viridescens*.

Modelos secundários	Equação
Linear	$\beta = aI + b$
Raiz quadrada	$\sqrt{\beta} = b(I - I_{min})$
Tipo Arrhenius	$\ln\beta = a\left(\frac{1}{I}\right) + b$
Exponencial	$\beta = a \cdot \exp(bI)$

3.5.3 Modelo dinâmico

Para a modelagem dinâmica, foi utilizado o modelo de Peleg (2006), baseado no modelo primário de Weibull. A equação (3.1) foi derivada e o tempo t , foi substituído pelo t^* (equação 3.2), onde a intensidade de radiação varia com o tempo. Os parâmetros de inativação são obtidos através do modelo secundário. As curvas que predizem a inativação de *W. viridescens* através do modelo dinâmico (equação 3.3) foram obtidas com o auxílio do *software* Matlab (MathWorks®, Natick, USA). A resolução da equação diferencial foi feita através do método de Range Kutta.

$$\log S(t) = -b(I)t^\alpha \quad (3.1)$$

$$t^* = \left(\frac{-\log S(t)}{b(I)}\right)^{\frac{1}{\alpha}} \quad (3.2)$$

$$\frac{d\log S(t)}{dt} = -b[I(t)]\alpha[I(t)] \left\{ \frac{-\log S(t)}{b[I(t)]} \right\}^{\frac{\alpha[I(t)]-1}{\alpha[I(t)]}} \quad (3.3)$$

3.5.4 Análise estatística

Para avaliar a capacidade preditiva do modelo de Weibull, foram avaliados os parâmetros estatísticos coeficiente de correlação (R^2) e raiz do erro médio quadrático (RMSE), calculado pela ferramenta GInaFIT®.

O coeficiente de correlação (equação 3.4) fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. Quanto maior o valor de R^2 ($0 < R^2 < 1$), melhor é a predição do modelo (JIN et al., 2009).

$$R^2 = \frac{\sum(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{\sum(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{média do valor}_{\text{predito}})^2} \quad (3.4)$$

O erro médio quadrático (equação 3.5) apresenta o modelo de erro para os dados. O RMSE é uma medida de variabilidade residual e, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade do modelo de descrever os dados.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{n}} \quad (3.5)$$

Onde n é o número de observações experimentais e p o número de parâmetros do modelo.

Além dos dois parâmetros estatísticos já citados, o fator bias e o fator de exatidão foram utilizados para avaliar a capacidade preditiva do modelo primário e secundário. O fator bias (equação 3.6) representa a diferença média entre os valores observados e preditos e o fator de exatidão (equação 3.7) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados. Fator bias igual a 1 significa que o valor observado é exatamente igual ao predito. No entanto, quando bias for maior que 1, o valor predito é menor que o observado, indicando que o modelo falha de forma segura (*fail-safe*), se o fator bias for menor que 1, o valor predito é maior que o observado e indica que o modelo falha de forma perigosa (*fail-dangerous*) para a inativação microbiana (LONGHI et al., 2013).

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}})}{n}\right)} \quad (3.6)$$

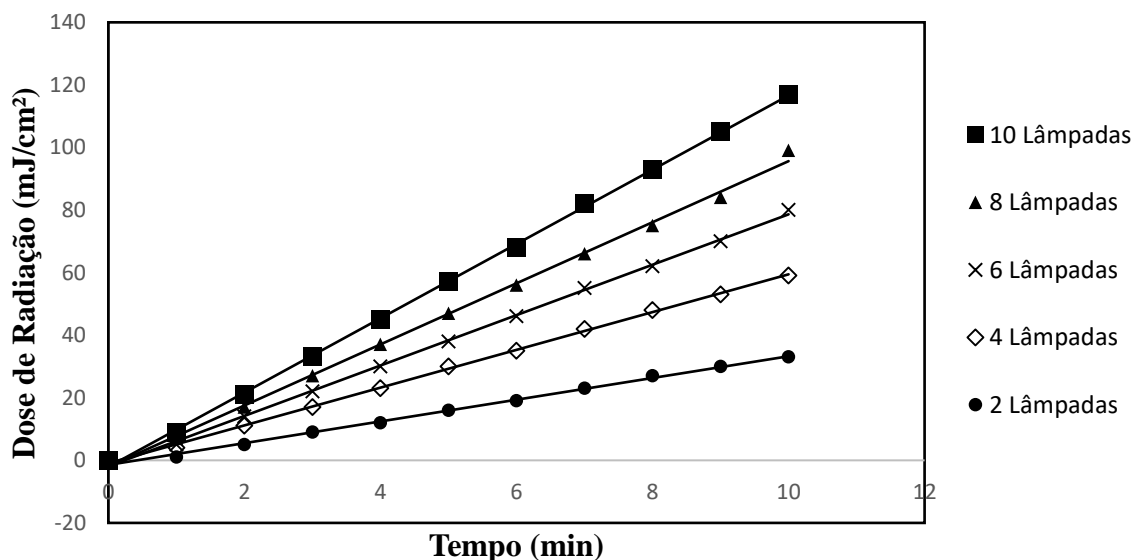
$$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}})|}{n}\right)} \quad (3.7)$$

4 RESULTADOS

4.1 INTENSIDADE DE RADIAÇÃO

As doses de radiação foram medidas nos tempos de 1 a 10 minutos, para 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas acesas. A Figura 9 apresenta o formato das curvas obtidas. A Tabela 2 apresenta as equações das retas obtidas e a intensidade correspondente a cada grupo de luzes acesas.

Figura 9 - Curvas de Radiação



As doses de radiação aumentam linearmente com o tempo, ou seja, no maior tempo e na máxima condição de trabalho (10 lâmpadas), é alcançada a maior dose de radiação. Os coeficientes angulares das equações de reta, apresentadas na Tabela 2 onde o y é a dose de radiação em mJ/cm², e x é o tempo em minutos, quando multiplicado por 1/6, são correspondentes à intensidade de radiação em que os microrganismos são submetidos.

$$y \left[\frac{mJ}{cm^2} \right] = a \left[\frac{mJ}{cm^2 \cdot min} \right] \cdot x [min] + b \left[\frac{mJ}{cm^2} \right]$$

$$a = \frac{mJ}{cm^2 \cdot min} \cdot \frac{1min}{60seg} \cdot \frac{10^4 cm^2}{m^2} \cdot \frac{10^3}{10^3} = \frac{W}{m^2}$$

Tabela 2 - Valores de intensidade de radiação para 2, 4, 6, 8 e 10 Lâmpadas

N° de Lâmpadas	Equação de Reta	R²	Intensidade (W/m²)
2	$y = 3,4727x - 1,4545$	0,997	0,579
4	$y = 6,0364x - 0,9091$	0,999	1,006
6	$y = 8,0545x - 1,9091$	0,998	1,342
8	$y = 9,7636x - 2$	0,998	1,627
10	$y = 11,873x - 2,0909$	0,999	1,979

4.2 DEFINIÇÃO DO MODELO PRIMÁRIO

Após a obtenção dos dados experimentais, de inativação de células de *W. viridescens* por radiação UV, as formas das curvas de inativação foram observadas e os modelos primários, Log-Linear e Weibull, ajustados às curvas foram escolhidos em função das formas. A Tabela 3 apresenta os valores de R² e RMSE para cada modelo testado, com 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas, correspondente às intensidades de 0,579W/m², 1,006 W/m², 1,342 W/m², 1,627 W/m² e 1,979 W/m², respectivamente.

Tabela 3 - Análise Estatística do ajuste dos modelos primários Log-Linear e Weibull aos dados experimentais das curvas de inativação de *W. viridescens* sob diferentes intensidades de radiação

Intensidade	R²	R²	RMSE	RMSE
	Log-Linear	Weibull	Log-Linear	Weibull
0,579	0,983	0,994	0,367	0,273
1,006	0,995	0,995	0,204	0,245
1,342	0,972	0,977	0,526	0,586
1,627	0,965	0,999	0,510	0,116
1,979	0,925	0,941	0,962	0,818

Com base nos dados estatísticos, o modelo de Weibull foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, já que apresenta valores de R² maiores que o Log-linear em quatro, das cinco condições de trabalho e valores de RMSE menores em três condições.

Com o modelo definido, foi possível calcular os parâmetros α e β , apresentados na Tabela 3. O parâmetro fator de forma (α) não apresentou variações relevantes entre as intensidades de radiação, portanto, foi fixado em 1,28, valor correspondente à média aritmética dos valores de α .

Foi utilizado o modelo de Weibull com α fixo para recalculer o parâmetro fator de escala (β) e o coeficiente estatístico R^2 , apresentados na Tabela 4, este apresentou um ajuste tão eficiente quanto Weibull com 2 parâmetros.

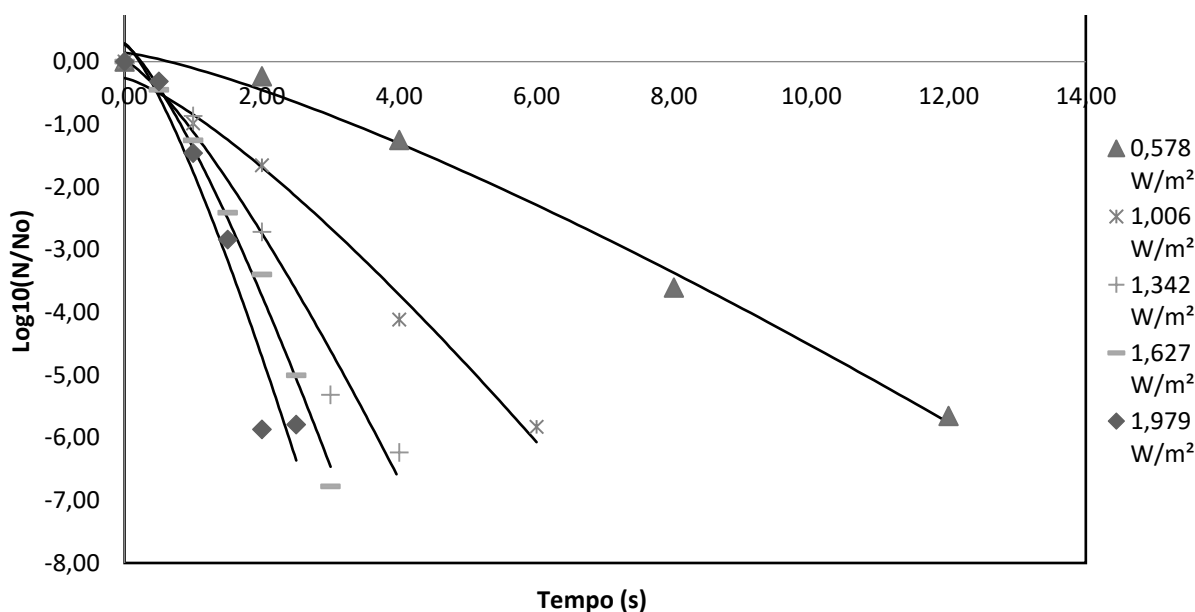
Tabela 4 - Valores dos parâmetros α e β para os modelos de Weibull (com 2 parâmetros) e Weibull com α fixo e análise estatísticas do ajuste para cada modelo

Lâmpadas	α	β	$\beta \alpha=1,28$	R^2 Weibull	$R^2 \alpha=1,28$
2	1,296	3,094	2,999	0,994	0,994
4	1,034	1,073	1,518	0,995	0,987
6	1,160	0,774	0,907	0,977	0,975
8	1,581	0,903	0,676	0,999	0,991
10	1,325	0,599	0,569	0,941	0,941

Periago et al. (2004), Van Boekel (2002) e Haberbeck (2011) também observaram que o parâmetro de forma (α) não apresentou variação considerável, e obtiveram bons resultados utilizando Weibull com α fixo.

Com o ajuste do modelo de Weibull com α fixo aos dados experimentais, foi possível observar o comportamento de inativação com o tempo para *W. viridescens*, quando submetida ao tratamento não térmico de irradiação por luz UV-C, demonstrado na Figura 10.

Figura 10 – Cinética de inativação para *W. Viridescens*



Todas as curvas de inativação apresentam a mesma forma, com a concavidade voltada para baixo, comprovando o que o parâmetro de forma já havia indicado ($\alpha=1,28 > 1$). A intensidade de radiação interfere relevantemente no tempo de inativação. É possível alcançar mais de cinco reduções logarítmicas tanto para a condição de 2 lâmpadas (0,578 W/m²) quanto para a de 10 lâmpadas (1,979 W/m²), no entanto, a primeira condição acontece em aproximadamente 12 segundos, enquanto que na condição máxima, a mesma redução logarítmica ocorre em aproximadamente 2 segundos.

Os coeficientes estatísticos R², RMSE, Fator Bias e Fator Exatidão, foram calculados e apresentados na Tabela 5, para avaliar o ajuste aos dados experimentais e a capacidade preditiva do modelo primário Weibull com fator de forma fixo igual a 1,28.

Tabela 5 - Análise estatística para o modelo primário Weibull com α fixo

Lâmpadas	Intensidade	R²	RMSE	BIAS	EXATIDÃO
2	0,579	0,994	0,262	0,996	1,023
4	1,006	0,987	0,381	1,057	1,057
6	1,342	0,975	0,608	0,997	1,065
8	1,627	0,991	0,290	1,006	1,035
10	1,979	0,941	0,821	1,004	1,100

Os valores demonstram que o modelo apresenta um bom ajuste, além de uma alta capacidade preditiva, com valores de fator Bias e Exatidão muito próximos de um, indicando que os valores preditos são praticamente iguais, ou muito próximos, dos valores observados.

Chun et al. (2009) avaliaram a cinética de inativação de bactérias patogênicas em presunto fatiado, quando submetidos ao tratamento por irradiação UV-C e constataram que o modelo primário de Weibull foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais.

4.3 DEFINIÇÃO DO MODELO SECUNDÁRIO

Para a escolha do modelo secundário, que descreve a variação do parâmetro β com a intensidade de radiação, obteve-se curvas a partir do ajuste dos modelos de Arrhenius, Raiz Quadrada, Exponencial e Linear, aos dados experimentais, representadas nas figuras 11,12,13 e 14, respectivamente. A Tabela 6 indica os valores do coeficiente estatístico R² para todos os

modelos testados. O modelo exponencial foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, com valor de R^2 0,9603.

Figura 11 – Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

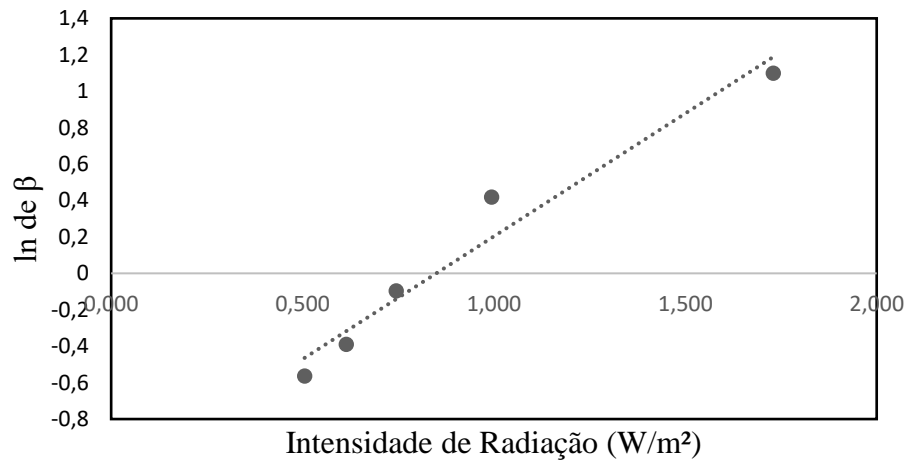


Figura 12 – Ajuste do modelo secundário Raiz Quadrada para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

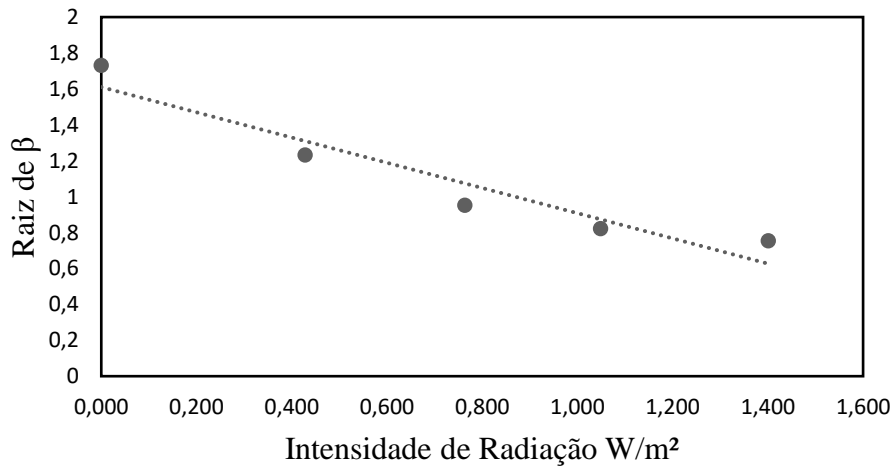


Figura 13- Ajuste do modelo secundário Linear para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

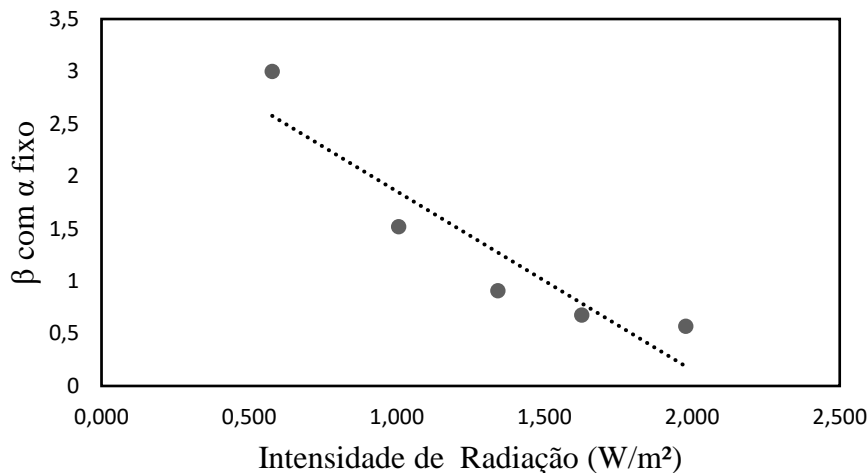


Figura 14 – Ajuste do modelo secundário Exponencial para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

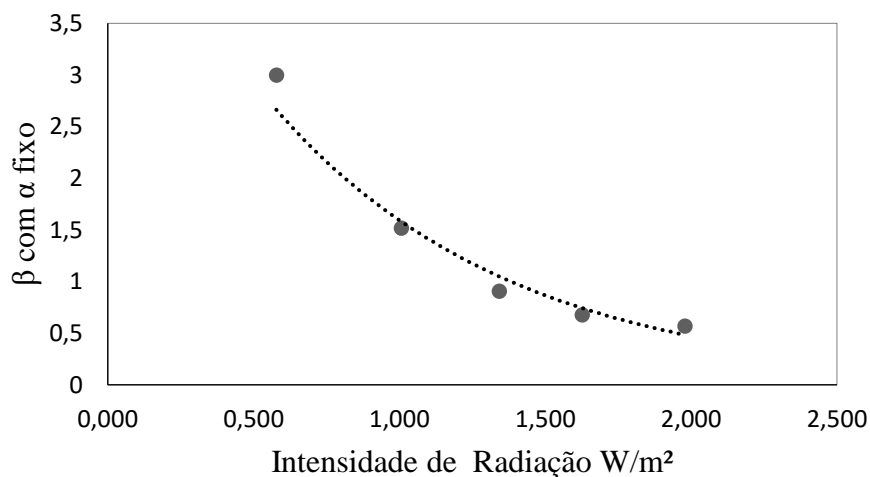


Tabela 6 - Análise estatística para a escolha do modelo secundário

Modelos	R ²
Arrhenius	0,959
Raiz Quadrada	0,914
Linear	0,856
Exponencial	0,960

A capacidade preditiva do modelo foi avaliada sob os parâmetros Fator Bias e Exatidão, que apresentaram valores de 1,010 e 1,121, respectivamente, indicando que os valores preditos são muito próximos dos observados.

4.4 DEFINIÇÃO DO MODELO DINÂMICO

Na prática, nem sempre é possível garantir que os processos ocorram em condições operacionais constantes. Na inativação microbiana por aplicação de luz UV, por exemplo, a principal condição controlada é a intensidade de radiação. Considerando que esta, por alguma razão, não se mantenha constante durante o processo, um modelo dinâmico foi definido.

Utilizando o *software* Matlab (MathWorks®, Natick, USA) é possível obter, a partir da equação de Peleg (2006) baseada no modelo primário de Weibull (equação 2.11), a cinética de inativação para *W. viridescens* quando a intensidade de radiação é variável.

Figura 15 – Simulação da Variação da intensidade de radiação com o tempo

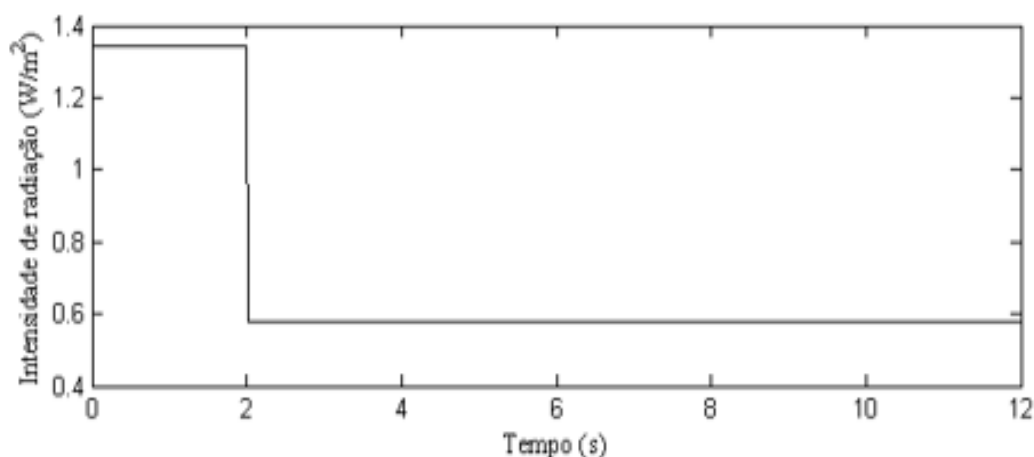
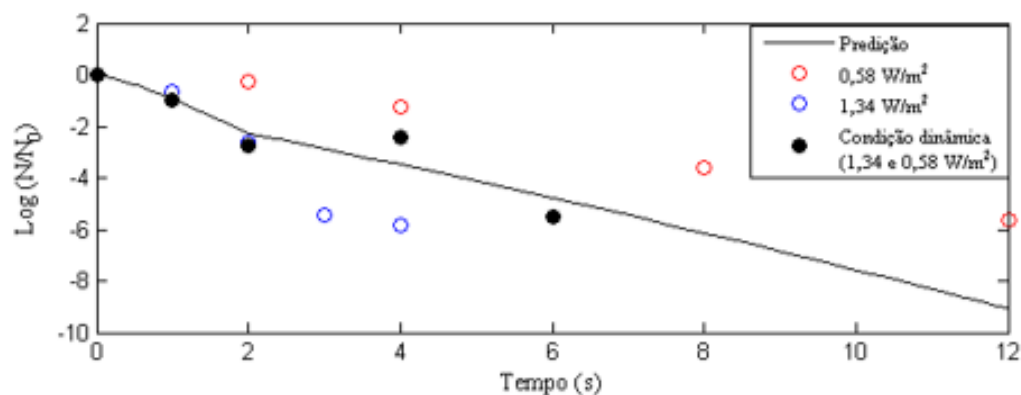


Figura 16 – Cinética de inativação de *W. viridescens* em função do tempo em condições variáveis de radiação. Os dados referentes à inativação nas condições constantes de intensidade de 0,579 W/m^2 e 1,342 W/m^2 foram acrescentadas com o objetivo de comparação dos resultados em condições variáveis e constantes



A Figura 15 representa a simulação da variação de radiação. Na primeira condição, do tempo zero até 2 segundos, a intensidade de radiação era de $1,34\text{W/m}^2$ (6 lâmpadas). Após 2 segundos a intensidade caiu para $0,58\text{ W/m}^2$ (2 lâmpadas) e permaneceu assim até o final do experimento. Com estas condições e utilizando a equação de Peleg (2006), com alfa fixo em 1,28 e β dependendo da intensidade de radiação (I), é possível obter a cinéticas de inativação de *W. viridescens* em condições variáveis de radiação (Figura 16).

Para a validação do modelo dinâmico, foram obtidos dados experimentais. Para isso, primeiramente placas contendo o inóculo foram submetidas à radiação na condição de 6 lâmpadas ($1,342\text{ W/m}^2$) nos tempos 1 e 2 minutos. Depois foram retiradas quatro lâmpadas, permanecendo 2 lâmpadas ($0,579\text{ W/m}^2$). Nesta segunda condição, o inóculo foi submetido à radiação nos tempos 4 e 6 minutos. O plaqueamento aconteceu em duplicata, com exceção do controle (que não passou pelo tratamento UV-C) feito em triplicata. A preparação de inóculo e o plaqueamento foram feitos como descrito nos itens 3.2 e 3.3.

Na Figura 16, estão representados os dados experimentais (marcador preto), a curva de inativação em condições variáveis de radiação, e os valores obtidos em condições constantes de radiação, nas condições de 2 e 6 lâmpadas, representadas pelos marcadores vermelho e azul, respectivamente. Estes resultados estão apresentados apenas com o objetivo de comparação de resultados.

Do tempo de zero até 2 segundos, quando a intensidade de radiação é de $1,34\text{W/m}^2$, os pontos azuis coincidem com os pretos, já que a inativação até ali segue em condições constantes. Ao reduzir a quantidade de lâmpadas, os valores experimentais para a condição dinâmica (marcador preto) se encontram entre os valores, para $0,58$ e $1,34\text{ W/m}^2$, obtidos em condições constantes.

Em condições variáveis, a inativação segue a mesma forma da inativação de condições constantes, no entanto, ao se reduzir a intensidade de radiação, a velocidade de inativação diminui, mas apresenta maior velocidade quando comparada aos dados experimentais de inativação constante a $0,58\text{W/m}^2$, já que alcança uma maior redução logarítmica em menor tempo.

Os fatores de Bias e Exatidão foram calculados e apresentaram valores de 1,007 e 1,183, respectivamente, permitindo concluir que o modelo dinâmico apresenta uma boa capacidade preditiva.

4 CONCLUSÕES

O principal objetivo da microbiologia preditiva é descrever o comportamento dos microrganismos, para que estes possam ser controlados, tanto no crescimento quanto na inativação. Os processos que envolvem biotecnologia, utilizam desta ferramenta para dimensionar equipamentos, controlar as condições de operações corretamente ou ainda prever a vida útil do produto. Neste trabalho, a microbiologia preditiva foi utilizada para prever a inativação de bactérias lácticas da espécie *W. viridescens*, quando submetidas ao tratamento de radiação por luz UV-C. As bactérias lácticas são deteriorantes e resistentes ao tratamento térmico, além de serem anaeróbias facultativas, por isso é comum estarem presentes em produtos cárneos embalados a vácuo. O tratamento não térmico de radiação de luz ultravioleta, faz o uso de luz UV-C que se encontra no espectro eletromagnético na faixa de 200nm e 280nm, e possui efeito germicida, atuando diretamente no DNA dos microrganismos levando-os a morte.

O modelo primário que melhor descreveu a inativação de *W. viridescens* ao longo do tempo foi o modelo de Weibull, onde o parâmetro de forma (α) foi fixado em 1,28 e o parâmetro de escala (β) foi calculado para as intensidade de radiação 0,579W/m², 1,006W/m², 1,342W/m², 1,627W/m², 1,927W/m². Para descrever a variação do parâmetro de escala com a variação da intensidade de radiação, o modelo secundário exponencial foi o que melhor se ajustou aos dados. Ambos apresentam fator Bias e Exatidão próximos de um, provando que tanto o modelo primário quanto o secundário possuem alta capacidade preditiva.

A cinética de inativação, para as condições de 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas, mostrou que quanto maior é a intensidade de radiação, menor é o tempo de inativação. Em todas as condições, foram alcançados mais do que cinco reduções logarítmicas sendo que, nas intensidades de 1,342W/m², 1,627W/m², 1,979W/m², foram alcançadas mais de seis reduções logarítmicas, ou seja, foram inoculadas 10⁸ UFC/mL de *W. viridescens* e após o tratamento de luz UV- C sobraram apenas 10³ UFC/mL. Segundo Battistella (2008), salsichas embaladas a vácuo apresentam 10² UFC/ mL de BAL no início do período de estocagem, então, se submetidas à radiação, na pior condição apresentada (2 lâmpadas) seria possível inativar comercialmente todas as bactérias lácticas desta espécie presentes. Uma grande vantagem deste tratamento é que isto seria alcançado em segundos, tornando-o viável para a utilização em indústrias.

A radiação UV-C depende de lâmpadas de mercúrio, e nem sempre é possível evitar a queima ou a diminuição da intensidade de radiação emanadas destas. Visando obter um modelo ainda mais representativo, que simule as condições reais do dia a dia de uma indústria, obteve-se

o modelo dinâmico, que descreveu a cinética de inativação com a variação da intensidade de radiação em função do tempo, a partir do modelo de Peleg (2006). O modelo dinâmico descreveu bem os dados, apresentando uma boa capacidade preditiva com valores de fator de bias e fator de exatidão iguais a 1,007 e 1,183, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.M.S. et al. : **Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com turbidez e cor moderadas**. Engenharia Sanitária e Ambiental, Vol. 7 - Nº 1 - jan/mar 2002 e Nº 2 - abr/jun 2002.

ALCANTARA, M. D. et al. Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v.6 n.1, p. 1-20, 2012.

ANTUNES, M. A. **Contaminação, Crescimento e Inativação de Microrganismos na Cadeia de Produção de Alface (Lactuca sativa L.) Variedade Vitória de Santo Antão**. 2009. 199 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ARAGAO, G. M. F. et al. Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of Escherichia coli under isothermal and non isothermal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 243-257, 2007

ARIMA, H. K. **Curso sobre qualidade e processamento de presunto cozido e apresuntado**. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, 1995, 120p. Trabalho não publicado.

AXELSSON, L. **Acid lactic bacteria: classification and physiology**. In: Salminen S, Wright AV, Ouwehand A (eds) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker Inc, New York, 2004.

BATTISTELLA, Patrícia Moises Davila. **Análise de Sobrevivência Aplicada à Estimativa da vida de Prateleira de Salsicha**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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.

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

CAMARGO, A. P. R. S. **Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo**. 2015. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CARR, Frank J.; CHILL, Don; MAIDA, Nino. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.281-370, jan. 2002. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1040-840291046759>.

CHUN, H. et al. Inactivation kinetics of listeria monocytogenes, salmonella enterica serovar typhimurium, and campylobacter jejuni in ready-to-eat sliced ham using uv-c irradiation. **Meat Science**, Barking, v. 83, n. 4, p.599-603, dez. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.07.007>>. Acesso em: 22 jul.2016.

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

DANNENHAUER, C.E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva**. 2012. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2008 182 p.

GAVA, A. J. Conservação de alimentos pelo Uso de Irradiação. In: GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 1984. p. 272.

GALINA, E. P. **Desenvolvimento de presunto cozido com redução de sódio**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Curso de Pós-Graduação Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

GUEDES, A. M. M. et al. Tecnologia de ultravioleta para preservação de alimentos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 27, n. 1, p.59-70, jun. 2009. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/14953>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Review: advantages and limitations on processing foods by UV light. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 3, p.137-147, 2004.

GOMES, A.C.R. **Processamento tecnológico de carnes curadas**. São Paulo: 2007. Originalmente apresentado para obtenção do grau de especialização no curso de pós-graduação "Lato Sensu" em vigilância Sanitária, Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, 2007.

HABERBECK, Leticia Ungaretti. **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano**. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. ArtMed, p. 51-72, 2005.

JIN, T. et al. Effects of pH and temperature on inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in liquid whole egg by pulsed electric fields. **International Journal of Food Science and Technology [S.I.]**, v.44, n. 2, p. 367-372, 2009

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.

LYHS U. **Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products**. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia.

LUCAS, J. Integrating MAP with new germicidal techniques. In: AHVENAINEN, R. **Novel food packaging techniques**. Boca Ratón, Flórida: CRC, 2003. Chap. 15

MARTINS, W. F. **Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas**. 2015. 82 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MASSAGUER, P. R. D. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo. Varela, 2006.

MONTEIRO, E. M.; TERRA, N. N. Processamento do presunto. **Ciência Rural**, Santa Maria v. 29, n. 4, p.721-725, dez. 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84781999000400025>>. Acesso em: 21 jul. 2016.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: aspectos básicos da microbiologia preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**. São Paulo, p. 41-51. 13 abr. 2000. Disponível em: <<http://bj.ital.sp.gov.br/artigos/brazilianjournal/2000/p0033.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

PELEG, M.; NORMAND, M. D. Calculating microbial survival parameters and predicting survival curves from non-isothermal inactivation data. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton**, v. 44, n. 6, p.409-418, nov. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408690490489297>> acesso em: 21 Jul. 2016.

PELEG, M. **Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: and inactivation**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 417p. ISBN 0849336457.

Periago, P.M., van Zuijlen, A., Fernandez, P.S., Klapwijk, P.M., ter Steeg, P.F., Corradini, M.G. and Peleg, M. (2004) Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data. **International Journal of Food Microbiolog** 95, 205–218.

ROÇA, R.O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 2000. 202p.

ROSS, T., McMEEKIN, T. A. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology** [online], v.23, p. 241-264, 1994.

SÄDE, E. **Leuconostoc spoilage of refrigerated, packaged foods**. Helsinki – Finland, 2011. Originalmente apresentada para obtenção do grau de mestre Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 2011

SALOMÃO, B. C. M. **Deteção de patulina e desinfecção de maçãs destinadas à produção de suco**. 238p, 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

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.

SCHAFFNER, D. W.; LABUZA, T. P. Predictive microbiology: where are we and where are we going? **Food Technology**. Chicago, v. 51, p. 95-99, 1997.

SARMENTO, C. M. P. **Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SLONGO, A. P. **Uso de alta pressão hidrostática em presunto fatiado: avaliação físico-química e sensorial e modelagem do crescimento microbiano**. 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TORREZAN, R. Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos cárneos. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p.249-266, jul. 2003.

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.

VAN BOEKEL, M. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 139-159, 2002.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology** [online], v. 10, p. 175-177, 1993.