



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA INATIVAÇÃO DE *Penicillium
expansum* EM SUCO DE MAÇÃ POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

Letícia Floriano

Florianópolis

2017

LETÍCIA FLORIANO

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA INATIVAÇÃO DE *Penicillium expansum* EM
SUCO DE MAÇÃ POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e 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.

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

Coorientador: Msc Cíntia Maia Braga

Florianópolis

2017

AGRADECIMENTOS

À professora Gláucia, por ter aceitado ser minha orientadora em seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos que levarei para sempre.

À Cintia, por ter sido além de co-orientadora, também amiga nesses últimos anos, obrigada por toda a paciência que tivesse ao me ensinar tudo que aprendi no laboratório, mesmo quando as coisas não davam certo, sua compreensão foi essencial.

À banca examinadora, Andréia e professora Débora, por terem aceitado este trabalho.

Aos meus pais Maria e Oscar, por sempre acreditarem em mim, e me proporcionarem esta oportunidade, sem a ajuda e confiança deles nada disso seria possível hoje.

Ao meu namorado Ritchelle, por toda paciência e compreensão desde o início da graduação, por ter me ajudado diversas vezes, você foi a pessoa que compartilhou comigo todos os momentos de tristezas e alegrias.

Às minhas amigas de graduação, Ana, Renata, Isabella e Helena, agradeço pelo apoio ao longo desses anos, que diversas vezes compartilhei momentos depressivos pós prova e vocês nunca me deixavam cair, mas também por todos os momentos felizes, pela amizade, pelas risadas, pela companhia diária. Nunca esquecerei esses anos que passei com vocês!

Aos meus amigos do tempo de colégio, Ana, Patrícia, Marinês e Mateus, pela amizade de sempre, que mesmo com a pouca convivência, estão sempre presentes.

À UFSC, pelo ensino gratuito e de qualidade.

"Nossos verdadeiros desejos sempre se transformam em realidade."
Paulo

Coelho

RESUMO

As deteriorações causadas por fungos são responsáveis por grande parte das perdas pós-colheita em maçãs. Entre os fungos deteriorantes, encontra-se o *Penicillium expansum*, causador do “mofo azul”, uma podridão que reduz a vida útil da fruta e pode estar associado à produção da micotoxina patulina. Estudos apontam que esta toxina pode causar severos efeitos crônicos e agudos em humanos. Com isto, torna-se necessário o estudo de técnicas para inativação do fungo produtor dessa toxina em maçãs e seus produtos, sendo o suco o principal produto derivado da maçã. A alternativa de inativação do fungo em suco de maçã, utilizada e avaliada neste trabalho foi a aplicação de radiação ultravioleta (UV-C) em 254 nm, uma vez que age sobre o DNA do microrganismo, não deixa resíduos e não forma compostos tóxicos. A microbiologia preditiva é uma importante ferramenta para descrever a inativação dos microrganismos em diferentes condições ambientais, por meio de modelos matemáticos. Esses modelos podem ser muito úteis no estabelecimento de processos de inativação. Diante ao exposto, o objetivo desse trabalho foi modelar a inativação de *Penicillium expansum* em suco de maçã com aplicação de radiação ultravioleta. Para a realização dos experimentos, foi preparada uma suspensão de esporos de *P. expansum* na concentração de 10^8 UFC/mL. O suco de maçã previamente diluído (12° Brix) foi inoculado com a suspensão em uma placa de Petri, e submetido à radiação UV-C, com cinco intensidades, por tempos pré-determinados. Para a modelagem matemática, primeiramente o modelo de Weibull foi ajustado aos dados experimentais para descrever a inativação ao longo do tempo, com isso foram obtidos os parâmetros de inativação (α e β). A influência da intensidade de radiação sobre os parâmetros obtidos nos modelos primários foi descrita pelos modelos secundários. Diante disso, foi obtido um modelo dinâmico que descreve a inativação de *P. expansum* em suco de maçã sob intensidades de radiação variando com o tempo. Pode-se concluir que a aplicação de UV-C tem potencial para ser usado na inativação de esporos de *P. expansum* contaminantes em suco de maçã e que os modelos obtidos podem ser utilizados para prever a inativação de esporos, mesmo em condições de intensidade variável de luz UV.

Palavras-chave: Maçã, Fungo, *Penicillium expansum*, Luz UV.

ABSTRACT

Degradations caused by fungi are responsible for most part of post-harvest losses in apples. Among the deteriorating fungi is *Penicillium expansum*, which causes "blue mold", a rot that reduces shelf life fruit and may be associated to the mycotoxin patulin production. Studies indicate that this toxin may cause severe chronic and acute effects in humans. Therefore, it is necessary to study techniques for inactivation of this fungus in apples and its products. The fungus inactivation alternative in apple juice, used and evaluated in this work was the application of ultraviolet radiation (UV-C) in 254 nm, since it acts on the microorganism DNA, leaves no residue and does not form toxic compounds. Predictive microbiology is an important to describe the microorganisms inactivation in different environmental conditions, by mathematical models. These models are very useful in establishing inactivation processes. The objective of this work was to model the inactivation of *P. expansum* in apple juice with the application of UV radiation. For the experiments, a suspension of *P. expansum* spores at 10^8 CFU / ml was prepared. The previously diluted apple juice (12° Brix) was inoculated with the suspension in a Petri dish, and subjected to UV-C radiation, in five intensities, for predetermined times. The Weibull model was adjusted to the experimental data to describe the inactivation over time, with which the parameters of inactivation (α and β). The influence of the radiation intensity on the parameters obtained in the primary models was described by the secondary models. In this way, a dynamic model was obtained that describes the inactivation of *P. expansum* in apple juice under radiation intensity varying. It can be concluded that the application of UV-C has potential to be used in the inactivation of spores of *P. expansum* contaminants in apple juice and that the obtained models can be used to predict the inactivation of spores, even in conditions of variable intensity of UV light.

Keywords: Apple, Fungus, *Penicillium expansum*, UV light.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Maçã contaminada com <i>P. expansum</i>	26
Figura 2 - Espectro eletromagnético.....	28
Figura 3 - Representação da radiação UV-C no DNA dos microrganismos.....	28
Figura 4- Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull com diferentes valores para o fator de forma α	32
Figura 5 - Placas de pré esporulação de <i>P. expansum</i> , após 7 dias à 25°C.....	35
Figura 6 - Placas de esporulação de <i>P. expansum</i> após 10 dias a 25°C.....	35
Figura 7- Fluxograma ilustrativo do processo experimental para o preparo da suspensão de <i>P. expansum</i>	36
Figura 8 - Fluxograma ilustrativo do processo experimental para inativação de <i>P. expansum</i>	37
Figura 9 - Equipamento de radiação.....	38
Figura 10 - Disposição das lâmpadas para os experimentos com 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas.....	39
Figura 11 - Radiômetro.....	40
Figura 12 - Radiômetro ao lado da amostra dentro do equipamento de inativação.....	40
Figura 13 - Curvas para obtenção da intensidade de radiação com a utilização de 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas.....	45
Figura 14 - Cinética de inativação para <i>P. expansum</i> submetido a cinco intensidades de radiação (0,66; 1,27; 1,68; 1,84 e 2,10 W/m ²).....	47
Figura 15 - Ajuste do modelo secundário Linear para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α	49
Figura 16 - Ajuste do modelo secundário Raiz quadrada para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α	50
Figura 17 - Ajuste do modelo secundário Exponencial para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α	50
Figura 18 - Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α	51
Figura 19 - Ajuste do modelo secundário Linear para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	52
Figura 20 - Ajuste do modelo secundário Raiz quadrada para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	52
Figura 21 - Ajuste do modelo secundário Exponencial para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	53
Figura 22 - Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β	53
Figura 23 - Simulação da Variação da intensidade de radiação com o tempo.....	55
Figura 24 - Cinética de inativação de <i>P. expansum</i> em função do tempo em condições variáveis de radiação. Os dados referentes à inativação nas condições constantes de intensidade de 0,66W/m ² e 1,84W/m ² foram acrescentadas com o objetivo de comparação dos resultados.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos secundários avaliados para descrever a influência da intensidade de luz (I) no parâmetro fator de forma (α) e fator de escala (β) da inativação de <i>P expansum</i>	42
Tabela 2 - Valores de intensidade de radiação para 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas	46
Tabela 3 - Análise Estatística para o modelo primário de Weibull	48
Tabela 4 - Análise estatística para o modelo primário de Weibull.....	48
Tabela 5 - Análise estatística para a escolha do modelo secundário sobre o parâmetro α	51
Tabela 6 - Análise estatística para a escolha do modelo secundário sobre o parâmetro β	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 MAÇÃ.....	22
3.2 SUCO DE MAÇÃ.....	23
3.3 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DA MAÇÃ.....	24
3.4 <i>Penicillium expansum</i>	25
3.5 TRATAMENTOS PARA GARANTIR A QUALIDADE DA MAÇÃ.....	26
3.5.1 Radiação ultravioleta.....	27
3.6 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	30
3.7 MODELOS MATEMÁTICOS	31
3.7.1 Modelos primários.....	31
3.7.2 Modelos secundários	33
3.7.3 Modelos em condições ambientais variáveis	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>P. expansum</i>	34
4.2 INATIVAÇÃO DE <i>P. expansum</i> EM SUCO DE MAÇÃ	36
4.3 EQUIPAMENTO DE RADIAÇÃO.....	37
4.3.1 Intensidade de luz aplicada para inativação de <i>P. expansum</i>	39
4.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA.....	41
4.4.1 Modelo primário.....	41
4.4.2 Modelo secundário	41
4.4.3 Modelo dinâmico.....	42

4.5 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS MODELOS.....	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 INTENSIDADE DE RADIAÇÃO.....	45
5.2 DEFINIÇÃO DO MODELO PRIMÁRIO.....	46
5.3 DEFINIÇÃO DO MODELO SECUNDÁRIO.....	49
5.4 DEFINIÇÃO DO MODELO DINÂMICO.....	54
6 CONCLUSÃO.....	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Maçã (*Malus domestica* Borkh) é uma das frutas mais produzidas e consumidas no mundo, com diversas espécies e variedades e traz inúmeros benefícios à saúde por ser rica fonte de compostos antioxidantes, carboidratos, minerais essenciais e fibras dietéticas (PFANNHAUSER *et al.*, 2001; RICE-EVANS, 2001; SADIK *et al.*, 2003).

De alto valor econômico, a maçã se enquadra entre as cinco frutas mais produzidas no Brasil (IBGE, 2014), com as principais cultivares Gala e Fuji, que representam cerca de 90% da área plantada (ABPM, 2016), sendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul os maiores produtores no país (BRASIL, 2013; IBGE, 2012). Apesar de a cultura ser relativamente recente, o Brasil já é considerado um grande produtor mundial, pela produção de variedades modernas, grande disponibilidade de terras e as condições climáticas adequadas (BITTENCOURT e MATTEI, 2008).

A demanda dos consumidores por uma variedade de alimentos prontos para comer com aspecto fresco e propriedades promotoras de saúde está aumentando continuamente. Neste contexto, as maçãs e seus produtos são particularmente populares (IGNAT *et al.*, 2014).

O suco concentrado é o principal produto derivado da maçã, cerca de 90% do suco de maçã produzido no Brasil é destinado à exportação. O maior importador são os Estados Unidos, que destinam este produto à elaboração de suco reconstituído e produtos infantis. No Brasil, não há lavouras de maçãs destinadas ao processo industrial, sendo assim, parte das frutas que não podem ser aproveitadas para o comércio *in natura* por não atenderem aos rígidos padrões de qualidade, são destinadas ao processamento, principalmente de suco de maçã (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Maçãs e sucos frescos podem ser veículos para a transmissão de patógenos, uma vez que podem ser facilmente contaminados com microrganismos durante a produção e processamento. Segundo Graça *et al.* (2013), o número de surtos de infecções humanas associado ao consumo de minimamente processados e sucos frescos esta aumentando.

As doenças pós-colheita podem ser causadas por algumas espécies de fungos, entre eles o *Penicillium expansum*, causador da “podridão azul” (XU e BERRIE, 2005). Este fungo é responsável pela maior parte das deteriorações em maçãs, podendo representar até 90%, gerando grandes perdas econômicas (BAERT, 2008; MORALES, 2008; BLUM *et al.*, 2007). Além da deterioração da fruta, *P. expansum* representa riscos à saúde em seres humanos através da produção de micotoxinas (MORALES *et al.*, 2008). Segundo relatado por Neri, Donati, Veronesi, Mazzoni e Mari (2010), *P. expansum* pode produzir quantidades

significativas de patulina, uma micotoxina mutagênica em hospedeiros, como maçãs, pêssegos, morangos e kiwi. Por isso, é necessária a utilização de tratamentos para prevenir essas podridões. Uma medida bastante utilizada são os fungicidas, no entanto, tem se observado os riscos à saúde e ao meio ambiente (MORALES, 2008).

A radiação ultravioleta é uma alternativa para a desinfecção de frutas frescas como maçãs e peras menos prejudicial que os métodos químicos. Os comprimentos de onda eficazes variam entre 200 e 280 nm (UV-C), mais especificamente a 254 nm. A radiação UV-C age pela destruição de estruturas do microrganismo, inibição da germinação ou retardo no desenvolvimento do fungo pela desnaturação protéica e desorganização da membrana plasmática (WOLFE, 1990). Inativando efetivamente microrganismos e, portanto, vem sendo considerado como método de preservação promissor (ORLOWSKA et al., 2015).

Além da inovação em tratamentos alternativos de desinfecção, há também um estímulo à aplicação da microbiologia preditiva, para garantir a segurança microbiológica e a qualidade dos alimentos. A microbiologia preditiva é uma importante ferramenta para descrever, através de modelos matemáticos, o comportamento (inativação, crescimento e sobrevivência) dos microrganismos submetidos a diferentes condições ambientais (WHITING e BUCHANAN, 1993).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar e modelar a inativação de *Penicillium expansum*, em suco de maçã, através da aplicação de radiação ultravioleta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter curvas de inativação de *P. expansum* em suco de maçã, sob aplicação de diferentes intensidades de radiação UV-C;
- Selecionar o modelo matemático que melhor descreva a inativação de *P. expansum* em função do tempo (modelo primário) para cada uma das intensidades de radiação aplicada;
- Selecionar um modelo que descreva a influência da intensidade de radiação sobre os parâmetros do modelo primário selecionado (modelo secundário);
- Obter um modelo matemático que descreva a inativação de *P. expansum* em função do tempo em condições de variação de intensidades de radiação;
- Avaliar a capacidade preditiva do modelo dinâmico obtido através da comparação da predição com os dados experimentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MAÇÃ

A maçã (*Malus domestica Borkh*), fruto da macieira, pertencente à família das *Rosaceas*, é originária da Ásia e da Europa. Sendo típica de regiões temperadas, tem boa produtividade em condições de inverno brando (SEBRAE, 2016).

Sua cultura tem ampla distribuição geográfica, tendo como principais países produtores a China, os Estados Unidos, e alguns países da União Européia, os quais apresentaram produção superior a 2 milhões de toneladas em 2009. Do total da maçã produzida, cerca de 70% destina-se ao consumo *in natura* e 30% para a indústria, sendo que metade desta quantidade é utilizada para a fabricação de suco e o restante para outros derivados, tais como: purê de maçã, chips de maçã, pratos prontos, entre outros produtos (BRDE, 2011).

O Brasil se transformou em um grande produtor de maçãs a partir dos anos 70, com algumas variedades desenvolvidas no próprio país, como a Rainha, Soberana e a Brasil. As principais cultivares produzidas são Gala e Fuji, que juntas representam cerca de 90% da área plantada (ABPM, 2016).

A Gala vem sendo substituída por clones de coloração mais vermelha, como a ‘Royal Gala’, ‘Imperial Gala’ e ‘Galaxy’ e é colhida nos meses de janeiro e fevereiro (ABPM, 2016). A gala é considerada de alta qualidade, devido as suas propriedades organolépticas como suculência, doçura, média acidez, e atraente por sua coloração vermelho-rajada (EPAGRI, 2002). A ‘Fuji’, que também tem frutos mais avermelhados, é colhida no período entre abril e maio, sendo uma fruta muito suculenta de sabor doce (ABPM, 2016).

A região sul é responsável por 98% da produção nacional de maçã, dos quais 49% são produzidas no estado de Santa Catarina, o maior produtor (LENZI, 2016), que foi responsável pela produção de 650 mil toneladas em 2016 (POTTER, 2016). De acordo com Bittencourt e Mattei (2008), fatores como a produção de variedades modernas, disponibilidade de terras, regiões com condições climáticas favoráveis, bem como preocupações com produtividade, infraestrutura de embalagem e conservação, transformaram o Brasil em um grande produtor mundial.

A maçã é benéfica ao organismo por possuir uma série de nutrientes, propriedade antioxidante combatendo os radicais livres, vitaminas A, C e D, ácido fólico, fibras e outros componentes. A capacidade antioxidante se deve, principalmente, aos compostos fenólicos,

como os flavonoides e os ácidos fenólicos (EBERHARDT; LEE; LIU, 2000; LEE et al., 2003), que fazem bem à saúde e auxiliam na redução do risco de diferentes tipos de câncer, protegem contra algumas doenças degenerativas e reduzem os riscos de doenças cardíacas (VITA, 2005; KAUR; KAPOOR, 2001). As fibras presentes na fruta auxiliam captando componentes tóxicos presentes no organismo, como a pectina, uma fibra solúvel que auxilia na diminuição do colesterol danoso do organismo (EDITORA INSUMOS, 2011).

3.2 SUCO DE MAÇÃ

Segundo a Instrução Normativa N°1, de 07 de janeiro de 2000, o suco de maçã é definido como bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã, através de processo tecnológico adequado. Deve obedecer algumas características, como cor branca e translúcida; sabor e aroma próprio; teor mínimo de sólidos solúveis (20 °C) de 10,5 ° Brix; acidez total expressa em ácido málico mínima de 0,15 g/100 g; açúcares totais naturais da maçã máximo de 13,5 g/100 g, e acidez volátil em ácido acético máxima de 0,04 g/100 g (BRASIL, 2000).

O suco de maçã pode ser processado e comercializado de diferentes formas: suco clarificado, suco polposo (não clarificado), suco concentrado congelado (clarificado ou não, com aproximadamente 42 °Brix) e suco concentrado de alto teor de sólidos solúveis (70 °Brix) (ROOT e BARRET, 2005). Em geral, os sucos de frutas são principalmente comercializados no mercado global na forma concentrada, pela facilidade de transporte e longa conservação (ROSA et al., 2006).

No Brasil, grande parte do descarte das maçãs é transformado em suco concentrado e cerca de 90 % deste é exportado para os Estados Unidos, onde são elaborados suco de maçã reconstituído e produtos infantis, cuja matéria prima constitui de cultivares de mesa com baixos teores de ácidos e taninos e elevados teores de açúcares, com corpo de boa aceitação sensorial (NOGUEIRA ET al., 2007).

O suco de maçã pronto para beber (11,5 °Brix) pode ser feito tanto a partir do suco recém extraído quanto do suco concentrado (SANT'ANA, 2007). Para a fabricação dos néctares, ocorre a etapa de formulação, onde são adicionados antioxidantes, como ácido ascórbico, e acidulantes, como ácido cítrico (BRASIL, 1988). O suco (11,5 °Brix) é

comumente pasteurizado em temperaturas entre 90-95 °C por poucos segundos, permitindo a estocagem em temperatura ambiente (BAHÇECI; ACAR, 2007).

A grande preocupação na indústria de sucos de maçã está principalmente relacionada aos microrganismos deteriorantes que produzem toxinas e são capazes de sobreviver ao tratamento térmico. As temperaturas necessárias para um processo de pasteurização eficaz, a partir do ponto de vista microbiológico, podem também produzir alterações organolépticas indesejáveis. Assim, a investigação sobre a microbiota de sucos inclui o desafio de avaliar a capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos resistentes ao calor (BAHÇECI e ACAR, 2007).

3.3 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DA MAÇÃ

Embora os avanços na tecnologia pós-colheita permitam a oferta de frutos de boa qualidade durante o ano inteiro para os consumidores (EPAGRI, 2006), ainda ocorrem perdas pós-colheita, devido à diminuição da firmeza de polpa e da acidez, além da ocorrência de podridões e distúrbios fisiológicos (NEUWALD, 2008).

Muitas doenças pós-colheita causadas por fungos são originárias do pomar. Podem ser citadas as seguintes doenças de armazenamento: Podridão azul (*Penicillium* spp.), Podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*), Side Rot (*Phialophora malorum*), Podridão olho-de-boi (*Pezizula malicorticis*), Mucor Rot (*Mucor piriforme*) (Kupferman e Pierson, 1986). Além dessas, segundo a Embrapa (2016), também pode ocorrer: Podridão-marrom (*Alternaria alternata* e *Alternaria* sp), Podridão-amarga (*Glomerella cingulata*, *C. gloesporioides* e *C. acutatum*), Podridão-branca (*Botryosphaeria dothidea*), Podridão-preta (*Botryosphaeria obtusa*), Podridão por *Rhizopus* (*Rhizopus nigricans*), Podridão-parda (*Monilinia fructicola*), Podridão-carpelar (*Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Botryosphaeria* spp., *Glomerella cingulata*, *Cryptosporiopsis perennans*, entre outros).

Vários fatores podem aumentar a incidência de podridões, entre eles incluem: colheita em estágio avançado de amadurecimento, danos na fruta, condições de alta pluviosidade no período de pré-colheita e contaminação nos galpões de seleção de frutas (EMBRAPA, 2016). Para reduzir a contaminação, são tomadas algumas medidas, como a colheita dos frutos no estágio adequado, higiene nas embalagens, sacolas de colheita e nas instalações onde se manuseia as maçãs, a desinfestação da água de lavagem dos frutos e do ambiente com produtos que contém cloro orgânico, a desinfestação das maçãs e da água com radiação UV, o

uso de fungicidas em pré-colheita e a utilização de atmosfera controlada (VALDEBENITO SANHUEZA, 1991 e 2001; VALDEBENITO SANHUEZA; MAIA, 2001; VALDEBENITO SANHUEZA et al., 2002 e 2006).

3.4 *Penicillium expansum*

O *P. expansum* é o maior responsável pelas perdas pós-colheita de maçãs durante o armazenamento refrigerado, causando a “podridão azul” (Figura 1) (BAERT, 2008; MORALES, 2008). Sua incidência em maçãs durante o armazenamento pode ser devido à contaminação no campo ou também na fase pós-colheita, podendo representar até 90% das perdas pós-colheita (BLUM et al., 2007). Além da deterioração da fruta, esse fungo apresenta riscos à saúde de seres humanos através da produção da micotoxina patulina, uma micotoxina termoestável (MORALES et al., 2008).

A podridão azul apresenta podridão aquosa, de coloração bege ou marrom, profunda, com margens internas e externas bem definidas. A área de penetração do fungo é reconhecida pela mancha aquosa e translúcida e pelo bolor azulado na superfície (KIMATI et al., 2005; EPAGRI, 2006). Quando exposto à alta umidade, o fungo produz pequenas massas brancas e azuis constituídas de micélio e esporos do fungo na área afetada. A podridão ocorre rapidamente e a área afetada pode ser facilmente retirada da fruta (KIMATI et al., 2005).

A maioria das contaminações por *P. expansum* em maçãs e peras armazenadas, surge a partir de esporos do ar ou da água que entram pelas feridas causadas durante a colheita e na pós-colheita ou até mesmo durante o manuseio de classificação (SANDERSON & SPOTTS, 1995)

Essa doença provoca prejuízos consideráveis durante a armazenagem, transporte e comercialização dos frutos (ROSENBERGER, 1990; BRACKMANN et al., 2005; EPAGRI, 2006).

Figura 1 - Maçã contaminada com *P. expansum*



Fonte: Santos, 2015

3.5 TRATAMENTOS PARA GARANTIR A QUALIDADE DA MAÇÃ

Para o controle de *P. expansum* em maçãs há vários métodos químicos, físicos e biológicos. Para o controle químico, podem ser citados a utilização de fungicidas em pré e pós-colheita (PRESTES, 2003) e o cloro para desinfestação da água de lavagem e do ambiente (BEUCHAT, 1998). Os tratamentos físicos incluem o controle da temperatura baixa (refrigeração em condições de atmosfera controlada) ou alta (com ar e água aquecidos) (LURIE, 2006). Ou ainda, a destruição das estruturas de microrganismos contaminantes com uso de radiação UV (US-FDA, 2011). O controle biológico pode ser feito com o uso de indutores de resistência, que estimulam a produção de substâncias naturais (MOREIRA et al., 2002; BLUM et al., 2007).

Nas indústrias de frutas, o cloro (hipoclorito de sódio) é o desinfetante mais utilizado, pois a lavagem com soluções sanitizantes é a única etapa em que é possível reduzir a contaminação microbiana (ALLENDE et al, 2009;. ÖLMEZ e KRETZSCHMAR, 2009). No entanto, o cloro compromete a saúde, pois as reações químicas de cloro com matéria orgânica pode criar compostos tóxicos, tais como trihalometanos (ALLENDE et al, 2009;. GIL et al., 2009). É prejudicial ao meio ambiente, devido ao grande consumo de água (CASANI et al., 2005) e por conter substâncias capazes de afetar diretamente os ecossistemas, alterar a oxigenação da água e até poluir rios, lagos e mares. Portanto, tem havido um grande interesse na substituição desse método químico como desinfetante de frutas.

Os fungicidas utilizados em pré e pós-colheita reduzem os microrganismos patogênicos e, pelo efeito residual, protegem as frutas durante o armazenamento e o transporte (EMBRAPA, 2016). Contudo, têm sido observado o alto custo e os riscos de contaminação ambiental e de intoxicação no momento da aplicação (ANTONIAZZI & DESCHAMPS, 2006), além da presença de resíduos nos frutos (BRACKMANN et al., 2004). Isto resulta em restrições cada vez maiores ao uso de agroquímicos, buscando alternativas que sejam eficazes no controle de doenças, mas que não comprometam a segurança do alimento e do meio ambiente (CONWAY et al., 2005; PERUCH & SILVA, 2005; DROBY, 2006).

Segundo Kader (1992), o processo mais indicado para prolongar a vida útil pós-colheita de frutos e hortaliças é a refrigeração, pois a temperatura é um dos fatores ambientais que mais influenciam a qualidade de frutos e vegetais pós-colheita (WATADA e QI, 1999). No entanto, refrigeração não controla totalmente as podridões, sendo indicada em combinação a outros métodos. Outro aspecto importante, é que o fruto ao ser recebido nas unidades de embalagem deve ser refrigerado o mais rápido possível para remover o calor do campo, a fim de reduzir a respiração dos frutos e o crescimento de fungos (KUPFERMAN e PIERSON, 1986).

A introdução de novas tecnologias na indústria de alimentos como técnicas não-térmicas pode reduzir o tempo de processamento e melhorar as condições de operação industriais permitindo a inativação de microrganismos em temperaturas subletais, resultando em produtos de alta qualidade que preservam as características naturais, assim, melhor preservação das propriedades sensorial, nutricional e funcionais dos alimentos (MAFTEI et al., 2014).

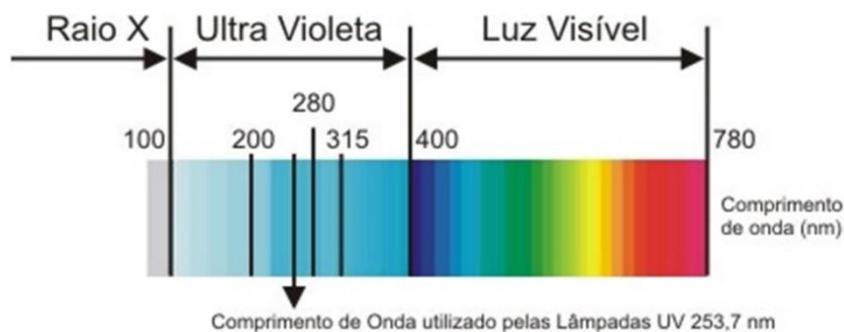
Além disso, essas técnicas são consideradas como mais benéficas em relação aos outros métodos de tratamento, devido a seu menor consumo de energia, redução do tempo de processamento e por não ser prejudicial ao ambiente. Esta cria um equilíbrio global entre processador e expectativas dos consumidores uma vez que podem fornecer produtos de melhor qualidade e uma reduzida degradação ambiental, enquanto o processamento reduz custos e aumenta o valor agregado do produto (PEREIRA e VICENTE, 2010).

3.5.1 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta é uma porção do espectro eletromagnético que varia de 100 a 400 nm. É subdividida em UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm), UV-C (200-280 nm),

conhecido como intervalo germicida, uma vez que inativa efetivamente microrganismos; e UV de vácuo (100-200 nm), que pode ser absorvido por quase todas as substâncias e assim, pode ser transmitido apenas no vácuo (KOUTCHMA et al., 2009).

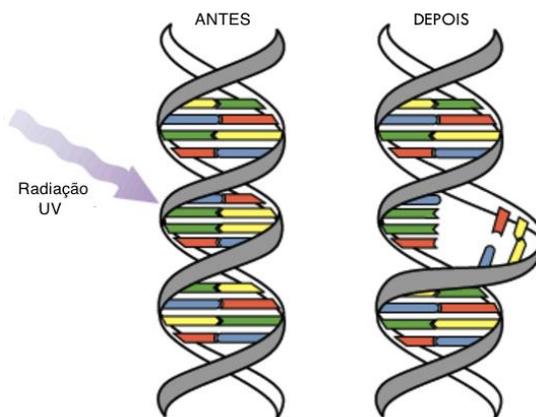
Figura 2 - Espectro eletromagnético



Fonte: <http://www.naturaltec.com.br/Desinfeccao-Ultravioleta-UV-Agua.html>

No comprimento de onda germicida (253,7nm), a radiação UV-C é suficiente para causar deslocamento físico de elétrons e quebra de ligações no ácido desoxirribonucleico (DNA) dos microrganismos (Figura 3). Isso altera seu metabolismo e reprodução, levando as células à morte (GUERRERO-BELTRÁN e BARBOSA-CÁNOVAS, 2004)

Figura 3 - Representação da radiação UV-C no DNA dos microrganismos



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

A radiação ultravioleta (UV-C) é uma das formas de reduzir a contaminação por *Penicilium expansum*. Na indústria de alimentos, a utilização de radiação ultravioleta apresenta várias vantagens quando comparada a outros métodos, visto que a radiação não deixa resíduos nas superfícies dos frutos e não gera compostos tóxicos (KEYSER et al.,

2008). Um processo a seco, que não necessita de aquecimento, a radiação UV-C apresenta simples emprego e o sistema é de pequeno custo efetivo para a esterilização de pequenas áreas, não apresentando restrição legal, como é o caso de alguns agentes químicos e de radiação de alta energia (BACHMANN, 1975).

Estudos indicam a eficácia na redução microbiana, com sua aplicação em pós-colheita de frutas e hortaliças, podendo aumentar a vida útil de produtos minimamente processados como melancia (FONSECA e RUSHING 2006) melão (BEAULIEU 2007, LAMIKANRA et al., 2005), maçãs, kiwis, limões, nectarinas, laranjas, pêssegos, peras, framboesas e uvas (LAGUNAS-SOLAR et al., 2006). Porém, o método apresenta a limitação de ter fraca penetração nos alimentos, e, sua aplicação é indicada para tratamentos de superfície de produtos, onde as atividades microbianas ocorrem principalmente na superfície (GARDNER & SHAMA, 2000).

Vários fatores influenciam a eficiência da desinfecção por luz ultravioleta, entre eles: dose de UV-C (Joules por metro quadrado), a velocidade de dose de UV-C ou intensidade de radiação (watts por metro quadrado), tempo de exposição (segundos), características de superfície, quantidade inicial de inóculo microbiano (OTTO et al. 2011), tipo de microrganismo, características morfológicas da planta, tais como a aspereza e a presença de feridas na superfície dos frutos influenciam a inativação microbiana (WONG et al., 1998; WOODLING e MORARU, 2005; SCHENK et al. 2008).

Segundo Valdebenito Sanhueza e Maia (2001), o principal efeito da radiação UV-C no controle de doenças em maçãs refere-se à redução microbiana pelo efeito germicida. Ou ainda, como relatado por Stevens et al. (2005), pela indução de resistência no hospedeiro.

Foi constatado que as características da superfície da fruta influenciam na inativação de *P. expansum*. Syamaladevi (2013) determinou dados cinéticos de inativação de *P. expansum* em discos de pera intactos e com feridas. O fungo foi inoculado e tratado com radiação UV-C, com doses variando de 0,101-3,06 kJ/m² a 23°C. Foi preciso uma intensidade de radiação maior para discos de pera feridos em comparação com discos de pera intactos.

Syamaladevi (2012) apontou que o tratamento com UV-C reduziu significativamente o número de *Escherichia coli* na superfície de pera intacta, superfície de pera ferida e na superfície de pêssego. A redução de *E. coli* na superfície da pera intacta foi maior do que na ferida e na de pêssego, devido à fraca penetração no tecido danificado e, no caso do pêssego, pelo efeito protetor da rugosidade de sua superfície.

Analisou-se a inativação com UV-C de *Penicillium expansum*, inoculado sobre a superfície de alguns frutos. Foram observadas reduções máximas de 1,8 (maçã), 2,4 (cereja),

2,6 (morango) e 2,8 (framboesa) log UFC/ g, depois de 1,2; 2,1; 3,3; e 3,3 kJ / m² de doses UV-C, respectivamente. Novamente, os resultados indicaram que a elevada rugosidade da superfície resultou numa taxa inferior de inativação de *P. expansum*. Esses resultados mostraram que UV-C é eficaz para a inibição deste fungo, mas que depende da morfologia dos frutos (SYAMALADEVI, 2014).

O tratamento com radiação UV-C em 1,2; 6,0; 12,0 e 24,0 kJ / m² foi estudado em relação à eficiência germicida e mudanças na aparência fresca de maçã minimamente processada. Independentemente da intensidade da UV-C, todos os tratamentos apresentaram o mesmo efeito germicida com 1,2 reduções logarítmicas. Foi concluído que a exposição dos tecidos vegetais à luz UV-C durante períodos excessivos está associada a danos celulares graves, que rapidamente se transformam numa diminuição da aparência fresca do produto (MANZOCCO et al., 2011).

A radiação UV é efetiva na redução de microrganismos presentes em líquidos translúcidos. É empregada em sistemas de tratamento de água (HUANG E TOLEDO, 1982; BACHMANN, 1975; HO et al., 1998; BLATCHLEY e ISAAC, 1992; KUO e SMITH, 1996; ANTOPOL e ELLNER, 1979; DIZER et al., 1993), no envasamento asséptico de alimentos (FLÜCKIGER, 1995), na pasteurização de sucos (SIZER e BALASUBRAMANIAM, 1999) e no tratamento de águas residuárias (HO et al., 1998; DIZER et al., 1993), obtendo-se redução de 95% dos coliformes totais com 65.000 a 70.000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2.\text{s}$ (HO et al., 1998),

3.6 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é uma área de pesquisa em que se aplicam modelos matemáticos para descrever o comportamento dos microrganismos (crescimento, destruição e sobrevivência) submetidos a diferentes condições ambientais durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos (BUCHANAN, 1993a; McMEEKIN et al., 1993 e HUANG, 2014). Os modelos são muito importantes na previsão microbiana de vida útil, controle de qualidade e avaliação de risco (HUANG, 2014).

Foi relatado que os modelos preditivos para alimentos se originaram em 1922 por Esty e Meyer, que descreveram o processamento térmico suficiente para destruir esporos de *Clostridium botulinum* tipo A por um modelo log linear, mostrando que a uma determinada temperatura, a velocidade de mortalidade da bactéria é constante (BARANYI & ROBERTS, 1994). A microbiologia preditiva moderna surgiu a partir de 1960, quando utilizaram modelos cinéticos para a solução de problemas com deterioração de alimentos, em seguida utilizaram

modelos probabilísticos para solucionar problemas de intoxicação alimentar, como botulismo e outras intoxicações (McMEEKIN; ROSS, 2002).

As propriedades dos alimentos, como atividade de água e pH; e fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, por exemplo; determinam o comportamento dos microrganismos (NAKASHIMA et al., 2000). A microbiologia preditiva descreve os efeitos desses fatores no crescimento ou inativação dos microrganismos nos alimentos. Para isso, são utilizados modelos matemáticos desenvolvidos geralmente a partir de experimentos em laboratório, que geram as curvas de crescimento ou inativação microbiana (DANNENHAUER, 2010).

3.7 MODELOS MATEMÁTICOS

Segundo Whiting e Buchanan (1993), os modelos preditivos são classificados, principalmente, em primários e secundários, de acordo com o comportamento microbiano que descrevem.

A inativação microbiana foi descrita por muito tempo como um modelo cinético de primeira ordem, ou modelo de Bigelow (MCMKELLAR; LU, 2004). Esse modelo considera que todos os microrganismos são idênticos e quando expostos a altas temperaturas, todos morreriam ou seriam inativados ao mesmo tempo. Hoje, considera-se que a inativação de muitos microrganismos não ocorre dessa forma. Por isso, têm sido encontrados na literatura modelos de inativação microbiana não-lineares, que são usados para descrever a cinética de inativação de diferentes microrganismos, com diferentes comportamentos (PELEG, 2006).

Os modelos preditivos possuem inúmeras vantagens: descrevem o comportamento microbiano sob diferentes condições, permitem prever a vida útil de alimentos estocados, avaliam a eficácia da higiene do processamento e distribuição, determinam o efeito de falhas nas condições de armazenamento, preveem a segurança microbiológica de um produto, auxiliam na análise e pontos críticos de controle, no desenvolvimento de novos produtos e na análise de risco (BARANYI & ROBERTS, 1994; NEUMEYER et al., 1997).

3.7.1 Modelos primários

Os modelos primários são aqueles que descrevem as mudanças no número de microrganismos ou outra resposta microbiana com o tempo, sob condições ambientais constantes.

Dentre os diferentes modelos primários propostos na literatura, o modelo de Weibull (Equação 1), proposto por Waloddi Weibull em 1936, é um dos modelos utilizados para descrever a inativação microbiana. Uma das vantagens desse modelo é a matemática simples e grande flexibilidade e foi inicialmente formulado em 1933 para modelagem de redução do tamanho de formas, conhecida como distribuição de Rosin-Rammler (PELEG, 2006).

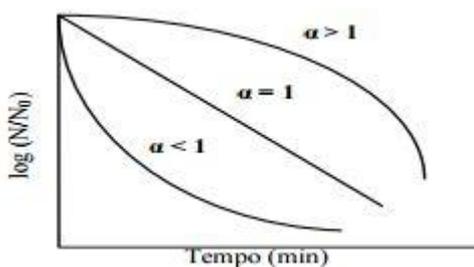
Segundo este modelo, as células microbianas de uma população possuem diferentes resistências e a curva de sobreviventes é a função distribuição acumulada do efeito dos agentes letais (CHEN & HOOVER, 2004).

$$\log \left(\frac{N(t)}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\beta} \right)^\alpha \quad (1)$$

Sendo $N(t)$ a população de microrganismos (UFC/mL) no instante t ; N_0 a população inicial do microrganismo (UFC/mL); t o tempo (min); α o fator de forma e β o fator de escala.

No modelo de Weibull, a direção da concavidade da curva de sobreviventes corresponde às diferentes vias de inativação microbiana (Figura 4).

Figura 4- Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull com diferentes valores para o fator de forma α .



Fonte: MCMKELLAR; LU, 2004

Quando $\alpha > 1$, as curvas apresentam concavidades voltadas para baixo, isso quer dizer que o tempo necessário para inativar um mesmo número de microrganismos diminui progressivamente. Quando $\alpha < 1$, as curvas possuem concavidades voltadas para cima, indicando que o número de microrganismos diminui rapidamente, mas à medida que a destruição ocorre, é formada uma cauda, que indica que os sobreviventes são mais resistentes (ARAGAO et al., 2007). Quando $\alpha = 1$, a curva de sobreviventes é loglinear considerada como cinética de primeira ordem (MCMKELLAR; LU, 2004).

3.7.2 Modelos secundários

Os modelos secundários descrevem como os parâmetros obtidos nos modelos primários se comportam com a variação de um parâmetro ambiental como temperatura, pH e atividade de água, por exemplo (WHITING, 1995). Os modelos mais utilizados na literatura são: modelo da raiz quadrada, modelo de Arrhenius e equações exponenciais.

3.7.3 Modelos em condições ambientais variáveis

Como já dito anteriormente, os modelos primários e secundários são baseados em trabalhos experimentais a condições constantes. Porém, algumas condições variam durante o processamento e armazenamento. Com isso, têm-se a necessidade de modelos que permitam descrever o comportamento microbiano sob condições que variam com o tempo (MCMEEKIN et al., 2008).

Peleg (2006) propôs um modelo não isotérmico de inativação (Equação 2) baseado no modelo primário de inativação isotérmica de Weibull. Assim, é possível prever a inativação dos microrganismos com o tempo ($\log S(t)$ vs t), considerando variável a temperatura de processo.

A equação do modelo primário de Weibull é reescrita pela equação:

$$\log S(t) = -b(T)t^{\alpha(T)} \quad (2)$$

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

Derivando a equação (2), a taxa de inativação logarítmica, para condições constantes, é dada pela equação (3):

$$\frac{d\log S(t)}{dt} = -b(T)\alpha(T)t^{\alpha(T)-1} \quad (3)$$

De acordo com Peleg (2006), o tempo que corresponde a qualquer dada taxa de sobrevivência é chamado de t^* , o qual foi isolado da Equação 2, e expresso pela Equação 4.

$$t^* = \left(\frac{-\text{Log}S(t)}{b(T)} \right)^{\frac{1}{\alpha(T)}} \quad (4)$$

Ao substituir a equação do t^* (4) na equação (3), obtém-se a equação diferencial ordinária (EDO) variável, expressa pela equação 5. Os modelos empíricos que descrevem $b(T)$ e $\alpha(T)$, são combinados com o perfil de intensidade de radiação variável $T(t)$ para produzir os termos $b(T(t))$ e $\alpha(T(t))$.

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b[T(t)]\alpha[T(t)] \left\{ \frac{-\log S(t)}{b[T(t)]} \right\}^{\frac{\alpha[T(t)]-1}{\alpha[T(t)]}} \quad (5)$$

Os perfis de temperatura utilizados podem, por exemplo, reproduzir processamentos térmicos aplicados na indústria. A utilização destes perfis não é apenas útil para planejar processos, mas também para assegurar a correção de falhas ocorridas nos equipamentos ou falhas humanas de onde os perfis descontínuos podem ser resultantes (PELEG, 2003). Exemplos mais comuns de sistema não isotérmico no processamento de alimentos seriam o rompimento do fornecimento de energia (CORRADINI e PELEG, 2005) e a variação de temperatura que ocorre dentro do tubo de retenção de trocadores de calor. No caso do tratamento com UV-C, pode-se substituir a condição de temperatura constante ou variável por intensidade constante ou variável da radiação UV-C aplicada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

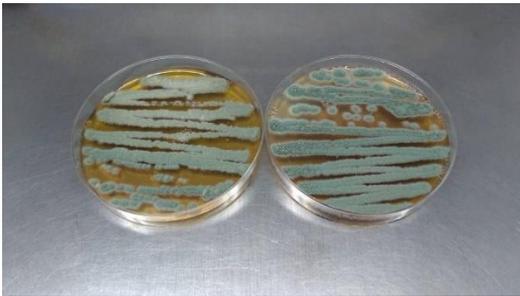
Nesta seção são apresentados os métodos para o estudo da redução da carga microbiana do suco de maçã e caracterização microbiológica.

4.1 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *P. expansum*

As cepas do fungo *Penicillium expansum* (CCT 4680) e (CCT 7549) foram doadas pela Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, SP, Brasil). O preparo da suspensão de esporos iniciou-se pela pré-esporulação por 7 dias a 25°C em placas de Petri, contendo meio ágar batata dextrose (PDA, Biolife®, Itália) acidificado a pH 3,5 com ácido tartárico 10% (Figura 5). Os esporos coletados foram adicionados às placas de esporulação, contendo meio Ágar Extrato de Malte (MEA, formulado de acordo com Pitt, Hocking e Diane (2009)), e incubados na temperatura de 25°C por 10 dias. Após este período, adicionou-se 10

mL de água destilada estéril em cada placa e, depois da raspagem, todo o conteúdo foi filtrado em 4 camadas de gaze estéril (Figura 6) e centrifugado a 3500 rpm (2000 x g) por 15 minutos, sendo eliminado o sobrenadante. Este procedimento foi repetido duas vezes ou até a constatação microscópica da ausência de hifas. Ao final, foi feita a resuspensão dos esporos em água estéril com 0,5% de Tween 80 (SALOMÃO, 2009). A suspensão de esporos foi armazenada em refrigeração a 4 °C até utilização. A Figura 7 mostra o procedimento para o preparo da suspensão de esporos.

Figura 5 - Placas de pré esporulação de *P. expansum*, após 7 dias à 25°C



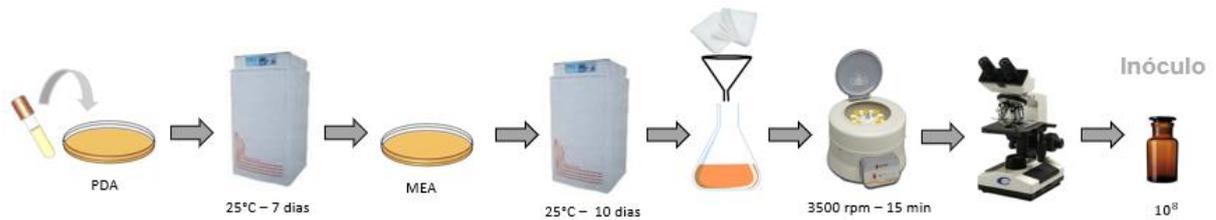
Fonte: Autor, 2017

Figura 6 - Placas de esporulação de *P. expansum* após 10 dias a 25°C



Fonte: Autor, 2017

Figura 7- Fluxograma ilustrativo do processo experimental para o preparo da suspensão de *P. expansum*



Fonte: Autor, 2017

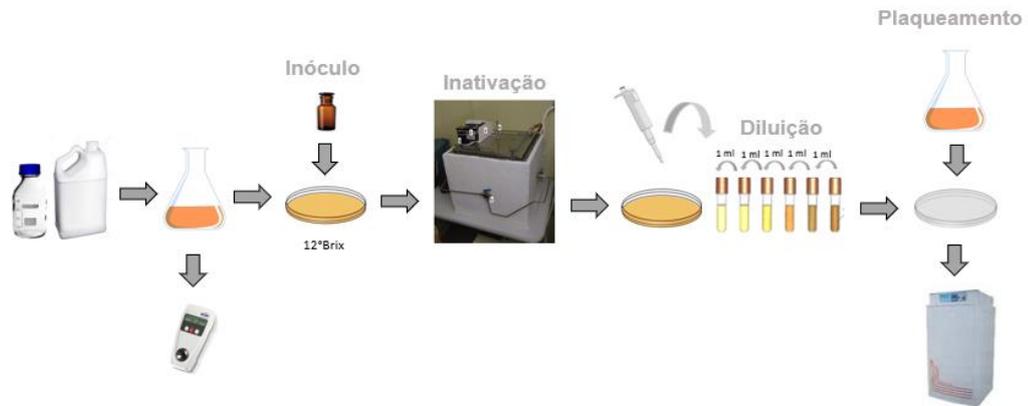
4.2 INATIVAÇÃO DE *P. expansum* EM SUCO DE MAÇÃ

Primeiramente, antes de cada experimento, o equipamento foi ligado 30 minutos antes para estabilização da radiação. Enquanto isso, dentro da câmara de fluxo laminar, o suco de maçã concentrado (70 °Brix) doado pela Fischer, foi diluído em água destilada estéril para a correção do teor de sólidos solúveis, utilizando um refratômetro, até atingir 12° Brix. Em seguida, foram inoculados 0,5 mL da suspensão de esporos na concentração de 10^8 UFC/mL em 25 mL de suco em uma placa de Petri (150mm x 15mm) e submetida à radiação UV-C (à 30 cm de distância das lâmpadas) por tempos pré-determinados (0, 3, 6, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos), sob agitação constante, baseados nos resultados prévios não apresentados neste trabalho. Em cada um dos tempos, foi retirado 1 mL de amostra para verificação da concentração de esporos após o tratamento. Esta metodologia foi baseada de acordo com o ensinado pela colega de laboratório Andréia Tremarim.

Com o suco tratado, foram feitas as diluições, transferindo 1 mL da diluição anterior para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada (0,1 %) e assim sucessivamente. Na sequência, 1mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri estéreis e descartáveis, previamente identificadas, e a placa foi então coberta por meio de cultura ágar batata (PDA) pH 3,5. As placas foram incubadas invertidas a 25°C por quatro dias.

Decorrido o tempo de incubação, as unidades formadoras de colônia foram contadas para a obtenção da curva de inativação em função do tempo. Os experimentos foram realizados em duplicata. A seguir as principais etapas do processo são apresentadas, em forma de fluxograma, na Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma ilustrativo do processo experimental para inativação de *P. expansum*



Fonte: Autor, 2017

4.3 EQUIPAMENTO DE RADIAÇÃO

O equipamento utilizado para inativar o microrganismo contém lâmpadas de mercúrio, que geram radiação UV-C. O equipamento é encamisado, passando por ele um fluido refrigerante (solução de etilenoglicol) que, por meio do sistema de refrigeração, mantém o equipamento na temperatura ideal (aproximadamente 10°C), garantindo que a temperatura não suba muito, e não influencie na inativação do microrganismo.

As placas de Petri com as amostras são colocadas em uma marcação fixa no centro do equipamento, de modo que recebam a radiação de forma uniforme. A imagem do equipamento é mostrada na Figura 9.

Figura 9 - Equipamento de radiação

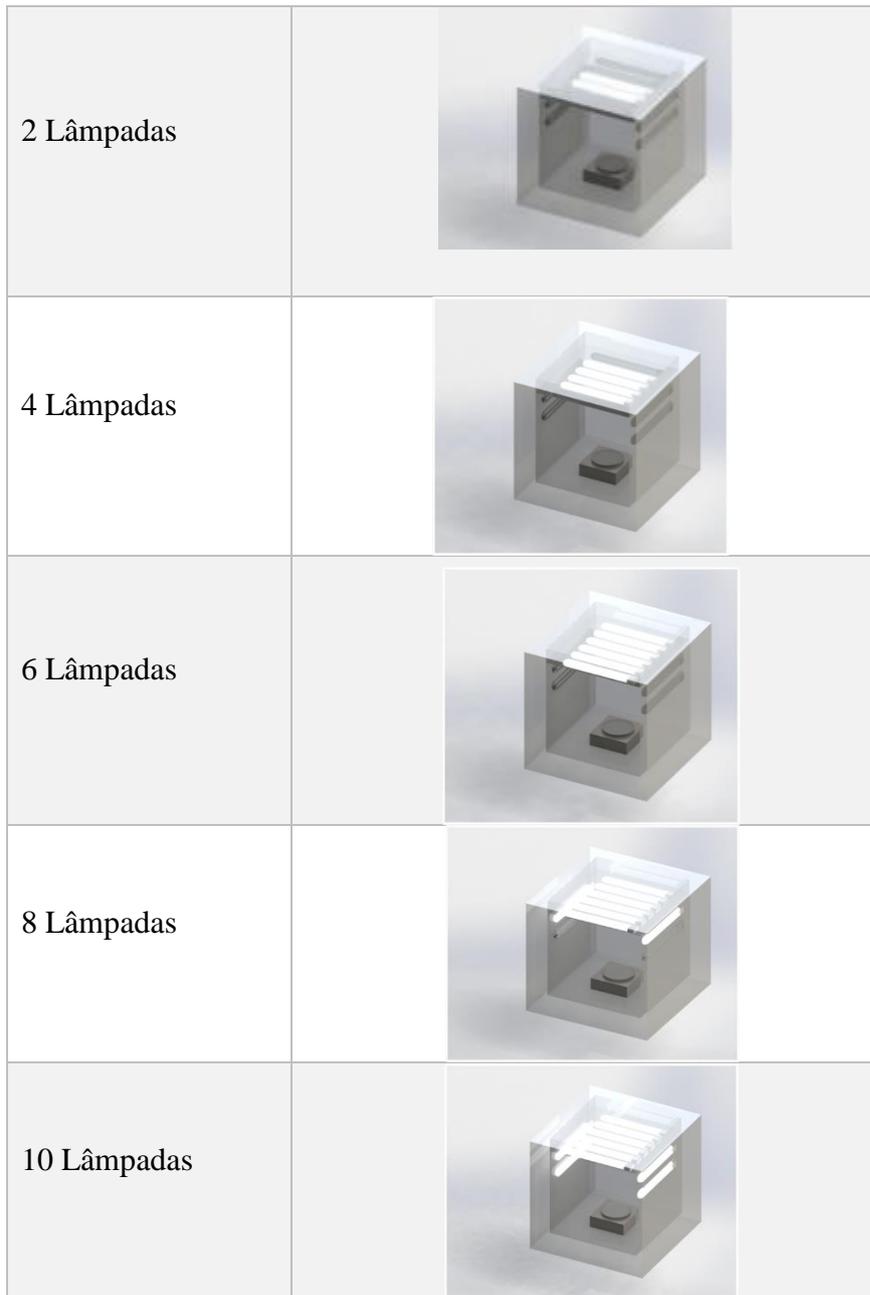


Legenda: 1) Indicador de temperatura (Digimec – BTC 9090); 2) Temporizador eletrônico digital microprocessado (TT-34); 3) Caixa de disjuntores; 4) Termopar tipo j (Salcas); 5) Válvula de duas vias (Hoke); 6) Banho termostático (microquímica); 7) Lâmpada fluorescente Germicida UV-C (Osram – 24W, 2G11);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

Os itens 1 e 4 da Figura 9 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 10 indica, de forma esquemática, a disposição das lâmpadas usada para os experimentos com 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas.

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



Fonte: Ramos, 2017

4.3.1 Intensidade de luz aplicada para inativação de *P. expansum*

O radiômetro (Figura 11) colocado dentro do equipamento de radiação, foi o aparelho utilizado para medir as doses de radiação (mJ/cm^2) no tempo aplicado.

Figura 11 - Radiômetro



Fonte: Autor, 2017

O aparelho foi colocado em um ponto determinado ao lado da amostra (Figura 12) durante a aplicação da luz ultravioleta, fornecendo a dose de radiação (mJ/cm^2). A verificação da dose de radiação foi realizada para todos os pontos obtidos nos experimentos. Este procedimento foi realizado para cada uma das condições de intensidade de radiação estudadas 0,66; 1,27; 1,68; 1,84 e 2,10 W/m^2 correspondentes a 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas, respectivamente. Assim, foram obtidas 5 curvas, uma para cada condição de dose de radiação aplicada com as unidades transformadas de mJ/cm^2 para W/m^2 e de minutos para segundos. Uma vez que o aumento da dose de radiação é linear em relação ao aumento do tempo, o coeficiente angular fornecido pela equação da reta obtida é correspondente à intensidade de luz aplicada naquele determinado número de lâmpadas em W/m^2 .

Figura 12 - Radiômetro ao lado da amostra dentro do equipamento de inativação



Fonte: Autor, 2017

4.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DAS CURVAS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA

4.4.1 Modelo primário

Para a modelagem das curvas de inativação do *P. expansum*, o modelo primário de inativação de Weibull foi escolhido devido às formas das curvas de inativação obtidas e ajustado aos dados experimentais, pelo *software* Matlab (MathWorks Inc, Natick, USA), que foi utilizado também para estimar os parâmetros de inativação alfa (α) e beta (β), assim como os valores de R^2 , RMSE, para cada intensidade de luz de 0,66 W/m²; 1,27 W/m², 1,68 W/m², 1,84 W/m² e 2,10 W/m², atingidas com o uso de 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas, respectivamente.

Para avaliar se o modelo escolhido descreve bem os dados experimentais, foram calculados os índices estatísticos apresentados no item 4.5.

4.4.2 Modelo secundário

A partir dos parâmetros de fator de forma (α) e fator de escala (β), obtidos através do modelo primário, foram comparadas quatro equações correspondentes aos modelos secundários (Tabela 1), para a escolha do melhor modelo que descreva a influência da variação de intensidade de luz sobre os parâmetros α e β . Foi utilizado o *software* Excel (Microsoft), para o ajuste do modelo aos dados, e para o cálculo de R^2 que foi utilizado para escolha do melhor ajuste.

Tabela 1 - Modelos secundários avaliados para descrever a influência da intensidade de luz (I) no parâmetro fator de forma (α) e fator de escala (β) da inativação de *P. expansum*.

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

4.4.3 Modelo dinâmico

Para a obtenção do modelo dinâmico, foi utilizado o modelo de Peleg (2006), baseado no modelo primário de Weibull. A equação foi derivada e o tempo t , foi substituído pelo t^* (Equação 4), onde a intensidade de radiação varia com o tempo. O parâmetro α (fator de forma) e β (fator de escala) são dependentes da intensidade e obtidos através do modelo secundário.

As curvas que predizem a inativação de *P. expansum* através do modelo dinâmico foram obtidas com o auxílio do *software* Matlab (MathWorks®, Natick, USA). A resolução da equação diferencial foi feita através do método de Range Kutta.

4.5 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS MODELOS

Para se avaliar a capacidade preditiva do modelo de Weibull, os seguintes parâmetros estatísticos foram calculados: coeficiente de correlação (R^2) e raiz do erro médio quadrático (RMSE). O coeficiente de correlação (Equação 6) fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. Quanto maior o valor ($0 < R^2 < 1$), melhor é a predição do modelo (JIN et al., 2009).

$$R^2 = \frac{\sum(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{\sum(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{média do valor}_{\text{predito}})^2} \quad (6)$$

O erro médio quadrático (Equação 7) apresenta o modelo de erro para os dados, por exemplo o quanto os valores preditos são próximos dos valores observados (ZIMMERMANN et al., 2011). O RMSE é uma medida da variabilidade residual e, quanto menor o seu valor, maior a capacidade do modelo de descrever os dados.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum(\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{n-p}} \quad (7)$$

Em que n é o número de observações experimentais e p o número de parâmetros do modelo. Para o modelo primário, estes cálculos foram realizados pelo software MATLAB.

O modelo secundário foi escolhido baseado no valor de R^2 , após foram calculados fator bias e exatidão, para confirmação do ajuste do modelo. Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Microsoft Office Excel®.

O fator bias (Equação 8) é uma estimativa para avaliar a diferença média entre os valores observados e preditos. Fator bias igual a 1 significa que o valor observado é exatamente igual ao predito. No entanto, quando bias maior 1, o valor predito é menor que o observado e indica que o modelo falha de forma segura (*fail-safe*) para modelos de inativação, enquanto fator bias menor que 1, significa que o predito é maior que o observado e que o modelo falha de forma perigosa (*fail-dangerous*) (LONGHI et al., 2013).

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}})}{n}\right)} \quad (8)$$

O fator exatidão (Equação 9) é a medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados, por se tratar de valores absolutos é sempre maior ou igual a 1, sendo que quanto maior o seu valor, menos precisa a estimativa da média.

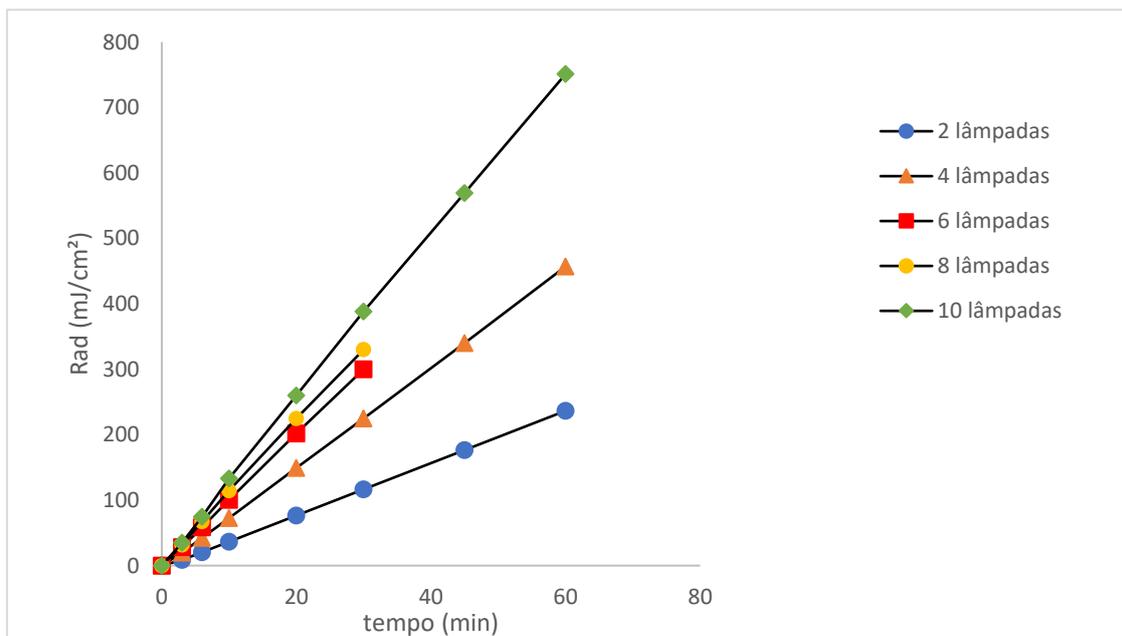
$$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}}) \right|}{n}\right)} \quad (9)$$

5 RESULTADOS

5.1 INTENSIDADE DE RADIAÇÃO

Em cada experimento, as doses de radiação (em mJ/cm^2) eram medidas para cada ponto do experimento (em um determinado tempo) através do radiômetro. Para trabalhar com diferentes intensidades de radiação, foi variado o número de lâmpadas. Desta forma, cada número de lâmpadas corresponde a uma intensidade de radiação. Como os experimentos foram realizados em duplicata, foi considerada a média da radiação entre os dois experimentos. As curvas obtidas para descrever a intensidade de radiação são apresentadas na figura 13.

Figura 13 - Curvas para obtenção da intensidade de radiação com a utilização de 2, 4, 6, 8 e 10 lâmpadas



Através da análise da Figura 13, percebe-se que as doses de radiação aumentam de forma linear ao longo do tempo.

Na literatura, a intensidade de radiação é expressa em W/m^2 , devido a isso foram feitos os cálculos para intensidade de radiação em W/m^2 . Sabendo que as doses de radiação variam linearmente com o tempo, e pela equação da reta:

$$Y = ax + b$$

Onde:

$$Y = \text{dose de radiação} \left(\frac{mJ}{cm^2} \right)$$

x = tempo (minutos)

$$a = \text{intensidade de radiação} \left(\frac{mJ}{cm^2 \cdot \text{min}} \right)$$

Transformando as unidades:

$$a = \frac{mJ}{cm^2 \cdot \text{min}} \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \cdot \frac{1 \text{ cm}^2}{1 \cdot 10^{-4} m^2} \cdot \frac{1 mW}{1 mJ} \cdot \frac{10^3}{10^3}$$

$$a = \frac{1 \text{ W}}{6 \text{ m}^2}$$

Assim, o coeficiente angular da reta quando multiplicado por 1/6, é correspondente à intensidade de radiação a que o fungo é submetido. A Tabela 2 apresenta as equações das retas obtidas e a intensidade correspondente a cada grupo de luzes acesas.

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

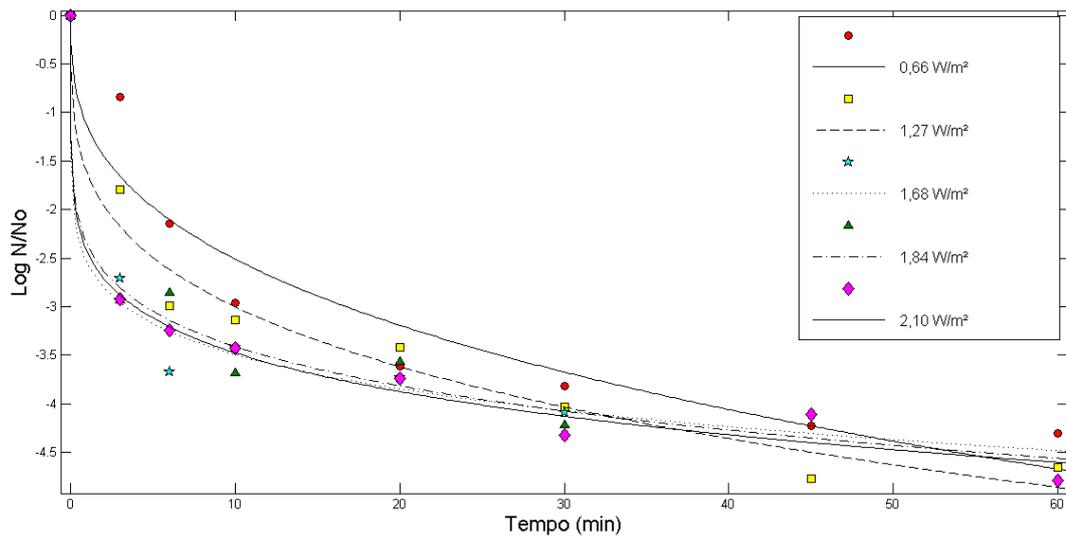
Nº de lâmpadas	Equação de Reta	R ²	Intensidade (W/m ²)
2	y = 3,9768x - 2,5586	0,9998	0,663
4	y = 7,6349x - 2,8093	0,9999	1,272
6	y = 10,064x - 0,8992	0,9999	1,677
8	y = 11,066x + 0,741	0,9996	1,844
10	y = 12,573x + 2,8495	0,9996	2,095

5.2 DEFINIÇÃO DO MODELO PRIMÁRIO

Foi obtida uma curva que demonstra a concentração de microrganismos em função do tempo para cada intensidade de radiação estudada (0,66; 1,27; 1,68; 1,84 e 2,10 W/m²).

Para a obtenção do modelo primário, que descreve a variação da quantidade de microrganismos com o tempo devido à aplicação de radiação ultravioleta em uma determinada intensidade de radiação, foi testado o modelo de Weibull com o auxílio da ferramenta MATLAB®. Este modelo foi testado devido à constatação do formato da curva com dados experimentais.

Figura 14 - Cinética de inativação para *P. expansum* submetido a cinco intensidades de radiação (0,66; 1,27; 1,68; 1,84 e 2,10 W/m²).



Observa-se na figura 14, o mesmo comportamento para todas as curvas de inativação, com a concavidade voltada para cima, comprovando o que o parâmetro de forma é menor do que 1 ($\alpha < 1$) (MCMKELLAR; LU, 2004). Analisando os resultados obtidos, percebe-se que, com a maior intensidade de radiação (2,10 W/m²), é possível alcançar mais de três reduções logarítmicas em cinco minutos. Enquanto que com a mínima intensidade (0,66 W/m²) essa mesma redução é obtida em menos de 20 minutos. Comprovando-se assim que a intensidade de radiação interfere consideravelmente no tempo de inativação.

Na literatura são encontrados poucos trabalhos que apresentam a modelagem da inativação de *P. expansum* por radiação ultravioleta, apenas os trabalhos de Syamaladevi em superfície de frutas, mas, não há registros em suco de maçã.

Syamaladevi (2014) analisou a inativação com UV-C de *Penicillium expansum*, inoculado sobre a superfície de maçã. Foram observadas reduções máximas de 1,8 log UFC/g em 2 minutos com uma intensidade de 10 W/m². Para o presente estudo em suco, para obter 1,8 reduções logarítmicas, na máxima intensidade de radiação (2,10 W/m²), foram necessários aproximadamente 9 segundos, segundo o modelo primário de Weibull.

Syamaladevi (2013) estudou a inativação de *P. expansum* com UV-C em discos de pêra intactos e com feridas. Em pêras intactas foram alcançadas 2,8 reduções decimais em 1 minuto e meio de processo com uma intensidade de 18,88 W/m², de acordo com o modelo primário de Weibull.

Segundo Manzocco, et al. (2011) o tratamento com luz UV-C poderia permitir a descontaminação microbiana e estabilização de cor do produto sem afetar o seu sabor.

A Tabela 3 apresenta os valores de R^2 , RMSE, α e β , fornecidos pelo MATLAB, para cada intensidade de radiação.

Tabela 3 - Análise Estatística para o modelo primário de Weibull

Lâmpadas	Intensidade	R^2	RMSE	α	β
2	0,66	0,9339	0,4466	0,3466	0,7017
4	1,27	0,9741	0,2749	0,2687	0,167
6	1,68	0,9777	0,2525	0,1389	0,001224
8	1,84	0,9774	0,2514	0,1623	0,005222
10	2,10	0,9882	0,1732	0,1566	0,003504

Com base nos dados estatísticos, vemos que o modelo de Weibull se ajustou bem aos dados experimentais, já que apresenta valores de R^2 próximos de 1, e valores de RMSE baixos, nas cinco intensidades de radiação.

Os coeficientes estatísticos Fator Bias e Fator Exatidão, foram calculados pelo programa Microsoft Excel® e apresentados na Tabela 4, para avaliar o ajuste do modelo primário de Weibull aos dados experimentais e sua capacidade preditiva.

Tabela 4 - Análise estatística para o modelo primário de Weibull

Lâmpadas	Intensidade	BIAS	EXATIDÃO
2	0,66	0,702	1,723
4	1,27	1,007	1,068
6	1,68	1,002	1,045
8	1,84	1,001	1,054
10	2,10	1,001	1,054

Pela análise dos índices estatísticos, pode-se dizer que o modelo de Weibull apresenta um bom ajuste aos dados experimentais, além de uma alta capacidade preditiva, com valores

de fator Bias e Exatidão muito próximos de um, indicando que os valores preditos são muito próximos dos valores observados.

5.3 DEFINIÇÃO DO MODELO SECUNDÁRIO

Para a obtenção do modelo secundário, foram comparadas quatro equações matemáticas: Linear, Raiz Quadrada, Exponencial e Arrhenius para selecionar o modelo secundário que melhor descreve a influência da intensidade de radiação (0,66; 1,27; 1,68; 1,84 e 2,10 W/m²) nos parâmetros de inativação de *P. expansum* (α e β) obtidos pelo ajuste do modelo de Weibul às curvas de inativação.

O modelo secundário foi escolhido com base nos valores de R², fornecidos nas curvas ajustadas de cada modelo aos dados experimentais, e também pela análise visual do melhor ajuste da curva aos dados experimentais.

As Figuras 15 a 18 mostram o ajuste dos quatro modelos secundários para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α :

Figura 15 - Ajuste do modelo secundário Linear para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α

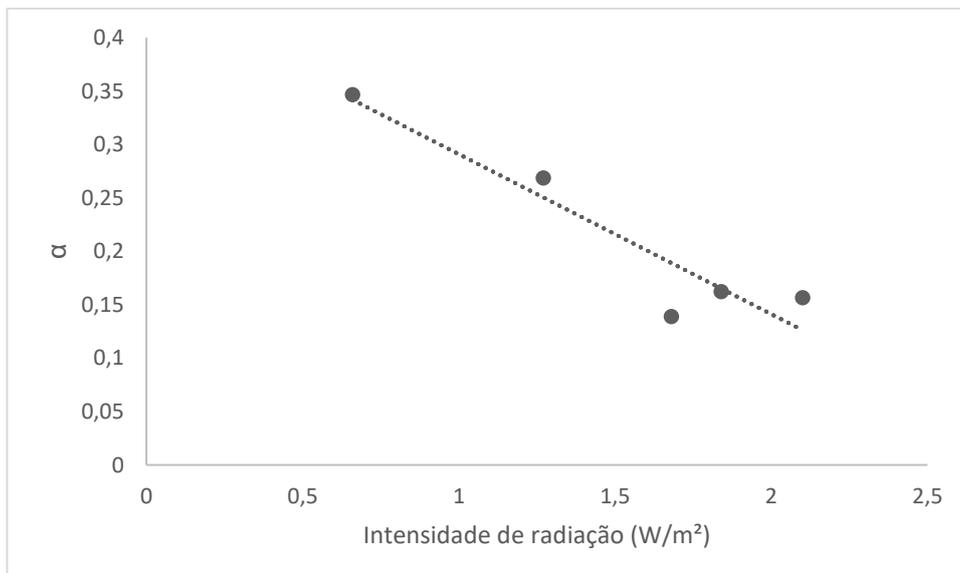


Figura 16 - Ajuste do modelo secundário Raiz quadrada para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α

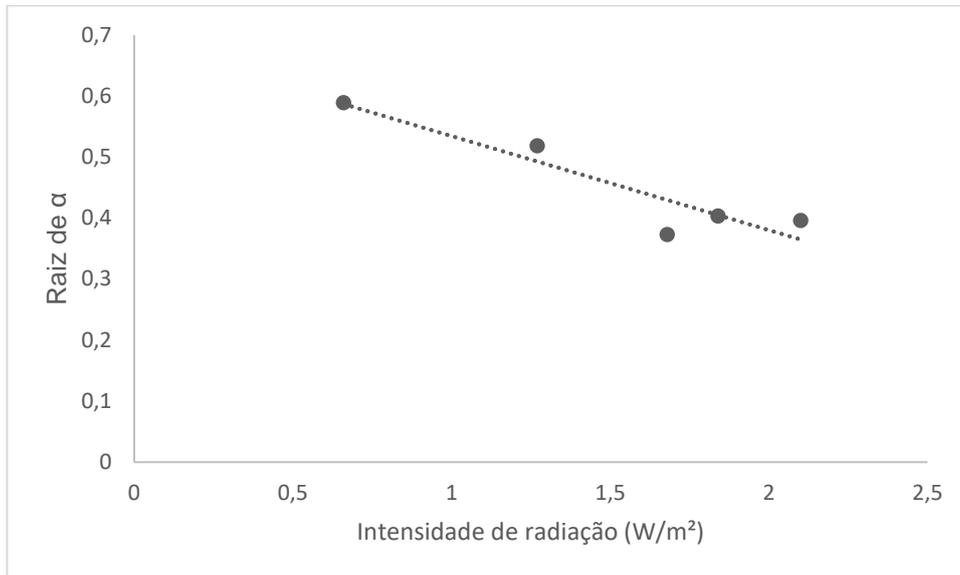


Figura 17 - Ajuste do modelo secundário Exponencial para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α

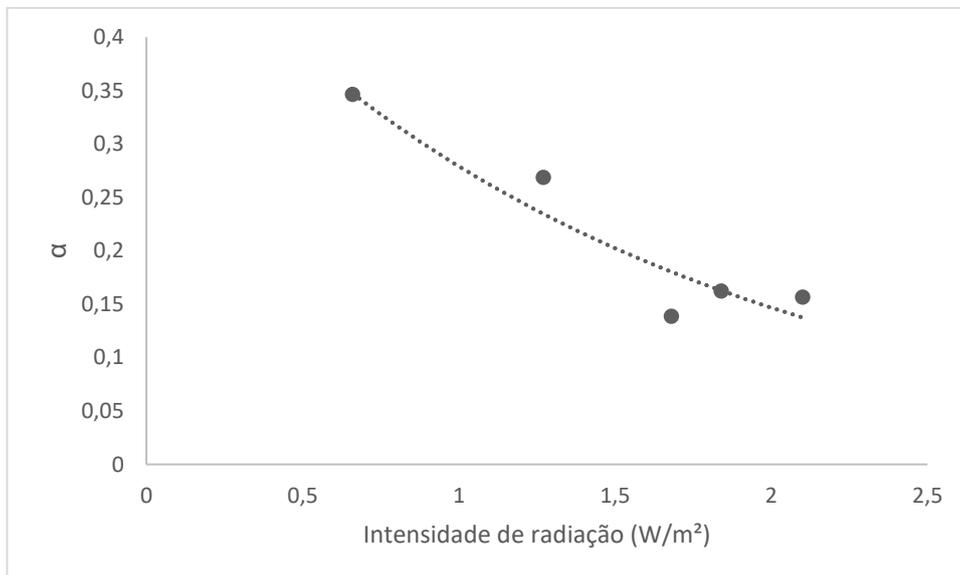


Figura 18 - Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário α

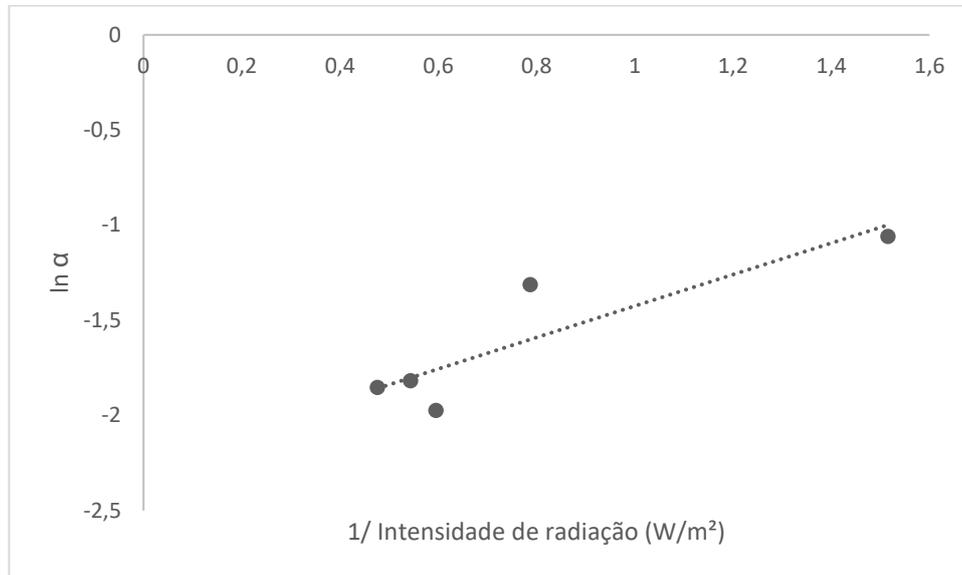


Tabela 5 - Análise estatística para a escolha do modelo secundário sobre o parâmetro α

Modelos	R²
Linear	0,882
Raiz Quadrada	0,861
Exponencial	0,835
Arrhenius	0,789

Comparando os valores do coeficiente estatístico R^2 , indicados na Tabela 5, para todos os modelos testados, o que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o modelo Linear, com valor de R^2 de 0,8817.

Para avaliar a capacidade preditiva do modelo, calculou-se os índices estatísticos Fator Bias e Exatidão, os quais apresentaram para o modelo Linear, valores de 1,006 e 1,133, respectivamente. Isso mostra que os valores preditos são muito próximos dos observados.

As Figuras 19 a 22 mostram o ajuste dos quatro modelos secundários para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β :

Figura 19 - Ajuste do modelo secundário Linear para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

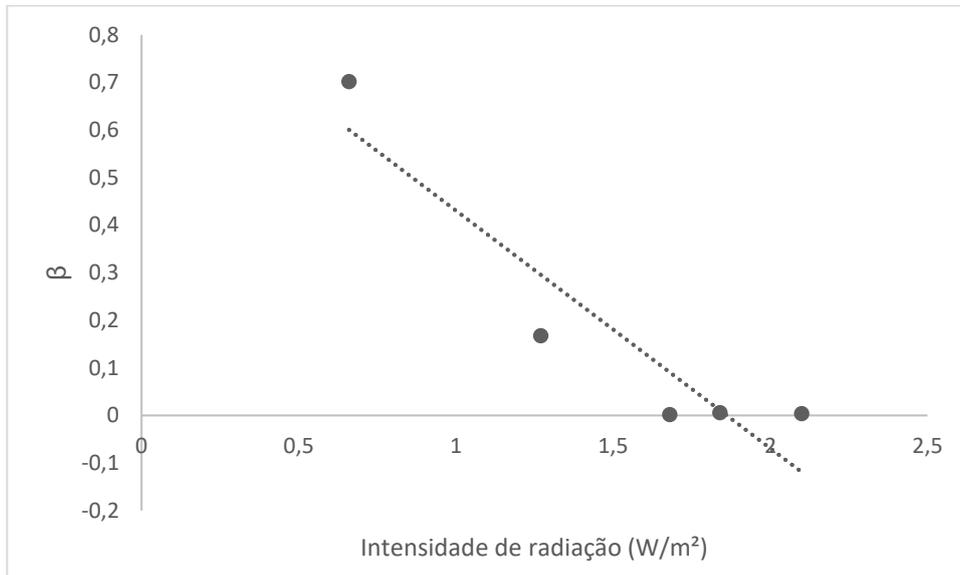


Figura 20 - Ajuste do modelo secundário Raiz quadrada para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

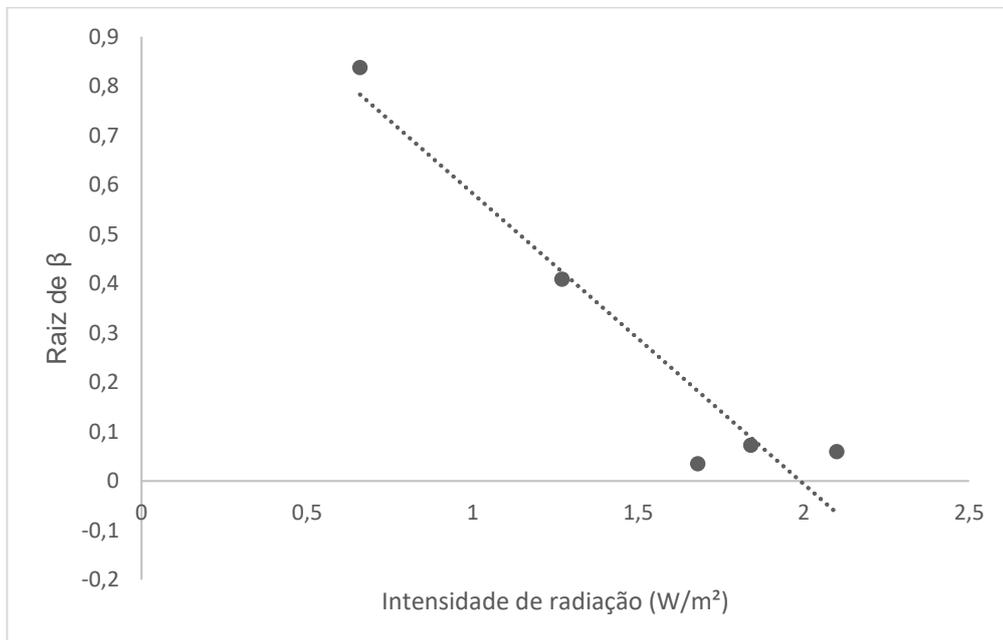


Figura 21 - Ajuste do modelo secundário Exponencial para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

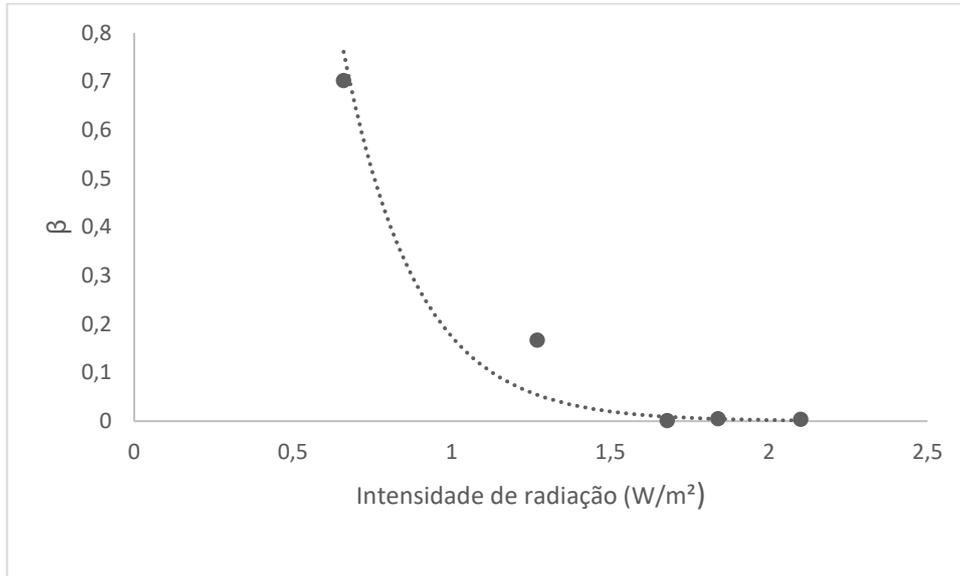


Figura 22 - Ajuste do modelo secundário de Arrhenius para descrever a influência da intensidade de radiação sobre o parâmetro primário β

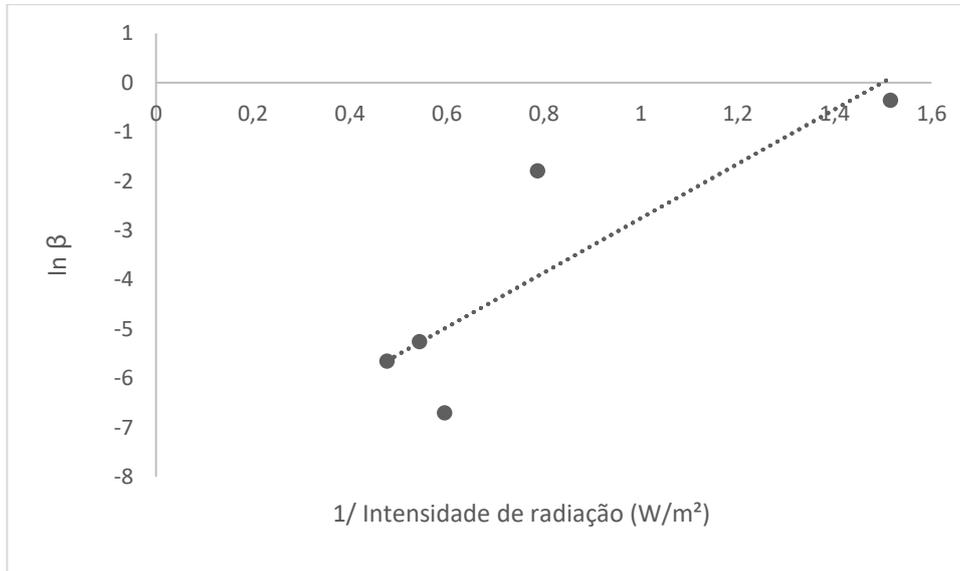


Tabela 6 - Análise estatística para a escolha do modelo secundário sobre o parâmetro β

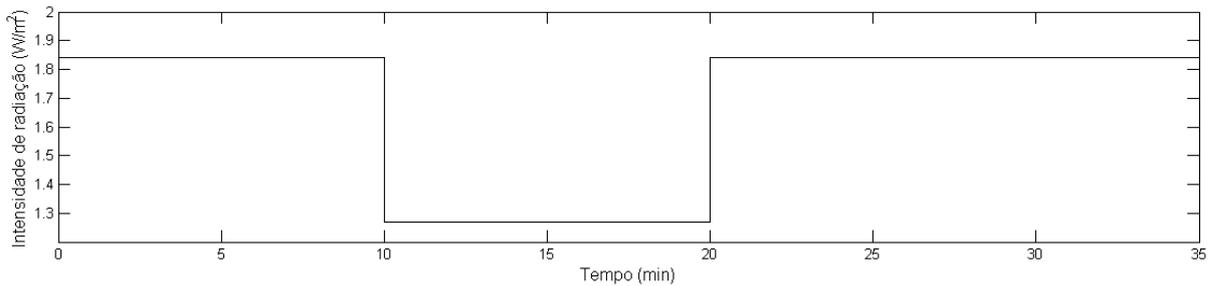
Modelos	R²
Linear	0,864
Raiz Quadrada	0,915
Exponencial	0,796
Arrhenius	0,741

Percebe-se que, o melhor valor de R^2 (0,915) foi com o modelo da Raiz quadrada, o qual ajustou-se melhor aos dados experimentais. Os índices estatísticos Fator Bias e Exatidão, foram calculados para avaliar a capacidade preditiva do modelo, e assim como no parâmetro α , indicaram que os valores preditos são muito próximos dos observados, com valores de 2,148 e 2,782 respectivamente.

5.4 DEFINIÇÃO DO MODELO DINÂMICO

Após a seleção dos modelos primários e secundários, foi utilizada a avaliação das respostas obtidas em condições ambientais constantes para prever a inativação microbiana em condições que variam com o tempo, a partir da equação de Peleg, (Equação 2) baseada no modelo primário de Weibull (Equação 1) descritas no item 3.7.3. Neste caso, a condição que varia com o tempo é a intensidade de radiação. Considerando que a inativação também possa variar ao longo do tempo, a variação de intensidade de radiação apresentada na Figura 24 foi utilizada para validação do modelo dinâmico. Após a obtenção da predição de inativação baseada no modelo dinâmico selecionado, foi realizado um experimento para posterior validação do modelo proposto.

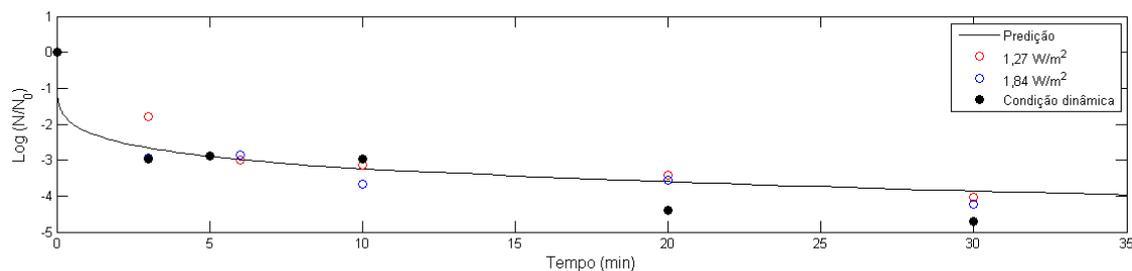
Figura 23 - Simulação da Variação da intensidade de radiação com o tempo



A Figura 23 demonstra a simulação da variação de radiação. Primeiramente foi simulado o uso de 8 lâmpadas acesas ($1,84\text{W/m}^2$) num instante de tempo de 10 minutos. Após este tempo foi simulada a queima de 4 lâmpadas e o processo continuou com 4 lâmpadas ($1,27\text{ W/m}^2$) por mais 10 minutos. Por fim as 4 lâmpadas foram acesas novamente ($1,84\text{W/m}^2$) por mais 15 minutos. Assim foi obtida a Figura 24, a partir da equação derivada de Weibull (Equação 5) e os parâmetros α e β dependentes da intensidade de radiação como proposto por Peleg (2006).

A Figura 24 mostra a cinética de inativação para *P. expansum* quando a intensidade de radiação é variável.

Figura 24 - Cinética de inativação de *P. expansum* em função do tempo em condições variáveis de radiação. Os dados referentes à inativação nas condições constantes de intensidade de $0,66\text{W/m}^2$ e $1,84\text{W/m}^2$ foram acrescentadas com o objetivo de comparação dos resultados



Após a definição do modelo dinâmico, foi realizado um experimento para validação do modelo proposto. O experimento realizado foi a reprodução da condição de variação de intensidade de radiação descrita na predição.

Como pode ser visto na Figura 24, durante o instante de tempo em que a intensidade de radiação é constante ($1,84\text{W/m}^2$), os dados experimentais (em preto) validam a predição.

Não foram encontrados na literatura modelos dinâmicos para o *P. expansum* com radiação ultravioleta.

6 CONCLUSÃO

Modelos matemáticos preditivos têm sido muito utilizados para quantificar e prever o comportamento dos microrganismos em diferentes condições ambientais, tais como temperatura, pH, atividade de água (Zwietering et al., 1990; Devlieghere et al., 2000; Brul et al., 2008). Neste estudo, os modelos matemáticos foram usados para descrever a inativação do fungo *Penicillium expansum* em suco de maçã quando submetidos a cinco intensidades de radiação ultravioleta (0,66; 1,27; 1,68; 1,84 e 2,10 W/m²). Sendo a intensidade de radiação a condição ambiental estudada. *P. expansum* é o fungo de maior incidência em maçãs, causando sua deterioração e produzindo patulina, uma micotoxina termorresistente, que acaba passando para o suco (CIEGLER, 1976).

O modelo primário de Weibull se mostrou capaz para descrever a inativação de *P. expansum* ao longo do tempo. Os parâmetros de inativação α e β obtidos, foram utilizados para estabelecer os modelos secundários, Linear para α , e modelo Exponencial para β , para as intensidades de 0,66; 1,27; 1,68; 1,84 e 2,10 W/m². Com os índices estatísticos, bias e exatidão, foi comprovada a alta capacidade preditiva dos modelos.

Foram obtidas cinco curvas de inativação, mostrando que é possível obter mais de 4 reduções logarítmicas para todas as intensidades estudadas, sendo que na maior intensidade de radiação (2,10 W/m²) é possível obter mais de 3 reduções em apenas 5 minutos de processo. Quanto maior a intensidade de radiação, menor o tempo de inativação.

O modelo matemático obtido para inativação de *P. expansum* em função do tempo em condições de variação de intensidades de radiação, foi validado para a predição dos dados experimentais.

Conclui-se que o uso de radiação ultravioleta pode ser um método alternativo para a redução de esporos de *P. expansum* em suco de maçã e que os modelos obtidos podem ser utilizados para prever a inativação de esporos, mesmo em condições de intensidade variável de radiação UV. Desse modo, este estudo pode ser útil para a indústria de sucos, ajudando a prever a inativação do microrganismo em diferentes intensidades de radiação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPM. Associação Brasileira de Produtores de Maçã. Disponível em: <<https://goo.gl/dZjeJu>>. Acesso em: 16 set. 2016.
- ANTOPOL, S.C., ELLNER, P.D. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ultraviolet radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 38, n. 2, p. 347-348, 1979.
- BACHMANN, R. Sterilization by intense ultraviolet radiation. *Brown Boveri Review*, v. 5, p. 206-209, 1975.
- BAHÇECI, K. S.; ACAR, J. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 266-273, 2007.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.277-294,1994.
- BITTENCOURT, C. C.; MATTEI, L. F. Panorama da cadeia da maçã no estado de Santa Catarina: Algumas evidências no segmento da produção. In: ENCONTRO DE ECONOMIA CATARINENSE, 2., 2008, Chapecó. p. 87.
- BLATCHLEY, E., ISSAC, R.A. Antimicrobial processes. *Water Environment Research*, v. 64, n. 4, p.391-398, 1992.
- BRASIL. Instrução Normativa N°1, de 07 de Janeiro de 2000. Aprova regulamento técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Produção de lavouras temporárias e permanentes**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 22 abr.2015.
- BRASIL. Resolução n° 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do Decreto n° 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 dez. 1988. Seção I.
- BRDE - BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Cadeia Produtiva da Maçã no Brasil: Limitações e Potencialidades. Cadeia Produtiva Maçã, 2011.
- DIZER, H., BARTOCHA, W., BARTEL, H., SEIDEL, K., LOPEZ-PILA, J. M., GROHMANN, A. Use of ultraviolet radiation for inactivation of bacteria and coliphages in pretreated wastewater. *Water Research*, v. 27, n. 3, p. 397-403, 1993.
- FLÜCKIGER, E. Alternative methods to avoid recontamination during aseptic filling and packaging. *Bulletin of the IDF* 300, p.52-56, 1995.
- GARDNER, D.W.; SHAMA, G. Modeling UV-induced irradiation of microorganisms on surfaces. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 63, n. 1 p. 63-70, 2000.
- GRAÇA, A. Low dose UV-C illumination as an eco-innovative disinfection system on minimally processed apples. **Postharvest Biology and Technology**, 85, 1-7, 2013.

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

HABERBECK, L. U. **Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano**. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

HO, C.H., PITT, P., MAMAIS, D., CHIU, C., JOLIS, D. Evaluation of UV disinfection systems for large-scale secondary effluent. *Water Environment Research*, n. 6, v. 70, p. 1142-1150, 1998.

HUANG, Y.-W., TOLEDO, R. Effect of high doses of high and low intensity UV irradiation on surface microbiological counts and storage-life of fish. *Journal of Food Science*, v. 47, p. 1667-1669, 1982.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 maio 2015.

IGNAT, A.; MANZOCCO, L.; MAIFRENI, M.; BARTOLOMEOLI, I.; NICOLI, M. C. Surface decontamination of fresh-cut Apple by pulsed light: Effects on structure, colour and sensory properties. **Postharvest Biology and Technology**, 91, 122-127, 2014.

INSUMOS, Editora. Propriedades nutricionais da maçã oferecem benefícios a saúde. Disponível em: <<https://goo.gl/kjgmWC>>. Acesso em: 17 set. 2016.

EBERHARDT, M. V.; LEE, C. Y.; LIU, R. H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 903-904, 2000.

EMBRAPA. Doenças causadas por fungos e bactérias. Disponível em: <<https://goo.gl/CvwLF4>>. Acesso em: 06 out. 2016.

KOUTCHMA, T.T; FORNEY, L. J.; MORARU, C. I. **Ultraviolet Light in Food Technology**, CRC Press, Boca Raton, p. 01-11. 2009.

KUO, J., SMITH, S.O. Disinfection. *Water Environment Research*, v. 68, n. 4, p. 503-510, 1996.

KUPFERMAN, E. (1986).Control of Major Postharvest Apple Diseases. **Post Harvest Pomology Newsletter 4**. Disponível em: <<https://goo.gl/1v42DB>>. Acesso em: 24 set. 2016.

LENZI, Alexandre. **Agricultura e pesca**. 2016. Disponível em: <<https://goo.gl/rSgf4x>>. Acesso em: 17 set. 2016.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas**. 2012. 114f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MAFTEI, N.A. Influence of processing parameters on the pulsed-light inactivation of *Penicillium expansum* in apple juice. **Food Control**, 41, 27-31, 2014.

MAFTEI, N. A.; RAMOS-VILLARROEL, A. Y.; NICOLAU, A. I.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Influence of processing parameters on the pulsed-light inactivation of *Penicillium expansum* in apple juice. *Food Control*, 41, 27-31, 2014.

MANZOCCO, L. Surface decontamination of fresh-cut apple by pulsed light: effects on structure, colour and sensory properties. *Postharvest Biology and Technology*, 61, 165–171, 2011.

MARTINS, W. F. **Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas**. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MATOS, K. H. O. **Inativação microbiana em ostras (*Crassostrea gigas*) empregando dióxido de carbono supercrítico**. 2013. 44f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MCGRATH, M. T. O que são fungicidas?. 2004. Disponível em: <<https://goo.gl/MNT9A9>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

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

MCMKELLAR, R. C.; LU, X. Modeling Microbial Responses in Food. 1. ed. Boca Raton: McMKellar, Robin C. Lu, Xuewen, 2004.

Morales, H., Marin, S., Obea, L., Patino, B., Domenech, M., Ramos, A. J., et al. (2008). Ecophysiological characterization of *Penicillium expansum* population in Lleida (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 122 ,243 e 252.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S; FRANCO, B. D. G. M. Aspectos básicos da microbiologia preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 3, n. 33, p. 41-51, 2000.

Neri, F., Donati, I., Veronesi, F., Mazzoni, D., & Mari, M. (2010). Evaluation of *Penicillium expansum* isolates for aggressiveness, growth and patulin accumulation in usual and less common fruit hosts. *International Journal of Food Microbiology*, 143 (3), 109 e 117.

NOGUEIRA, A., TEIXEIRA, S. H., DEMIATE, I. M., WOSIACKI, G. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 259-264, 2007.

PELEG, M. Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

PELEG, M. Advanced quantitative microbiology for foods and Biosystems:models for predicting growth and inactivation. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 417p. ISBN 0849336457

PFANNHAUSER, W.; FENWICK, G.R.; KHOKHAR, S. Biologically-active phytochemicals in food, Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001.

POTTER, H. Abertura do mercado para a maçã chinesa ameaça produção em Santa Catarina. 2016. Disponível em: <<https://goo.gl/G4rkJq>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

RAMOS, L.V. INATIVAÇÃO DE *Weissella viridescens* IN VITRO POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA. TCC – Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants, *Curr. Med. Chem.* 8, p. 797–807, 2001.

ROOT, W.H.; BARRET, D.M. Apples and apple processing. In: BARRET, D.M.; SOMOGYI, L.; RAMASWAMY, H. (Ed.). **Processing Fruits: Science and technology**. Boca Raton. CRC Press. 2005.

ROSA, S. E. S.; COSENZA, J. P.; SOUZA, L. T. Panorama do setor de bebidas no Brasil BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 23, p. 101-150, mar. 2006. Disponível em: <https://goo.gl/H3HSG7>. Acesso em: 24 jul. 2017.

SADIK, C.D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action, *Biochem. Pharmacol.* 65, p. 773–781, 2003.

SALOMÃO, B. C. M. Detecção de patulina e desinfecção de maçãs destinadas a produção de suco. 2009. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SANHUEZA, R. M. V. et al. Caracterização e controle das doenças de maçãs em pós-colheita. Disponível em: <<https://goo.gl/oadRWF>>. Acesso em: 16 set. 2016.

SANT'ANA, A. S. Avaliação quantitativa do risco da patulina em suco de maçã. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SANTOS, R.P.A. **Pós-colheita de maçãs na empresa maná maçã LTDA, São Joaquim, Santa Catarina**. 2015. 61f. Relatório de Estágio Obrigatório - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SEBRAE. **O cultivo e o mercado da maçã**. 2016. Disponível em: <https://goo.gl/XnAvdS>. Acesso em : 08 jul. 2017.

SENHOR, R.F. Manejo de doenças pós colheita. **Revista Verde**, v.4, n.1, p. 00 – 13, jan/mar, 2009.

SILVA, C. N. **Estudo da vida útil de linguça frescal de frango e modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas**. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SIZER, C. E & BALASUBRAMANIAM, V. M. New intervention processes for minimally processed juices. *Food Technology*, v.53, n.10, p.64-67, 1999.

STELLA, P. F. **Indutores de resistência a *Penicillium* spp. E seu efeito sobre a qualidade de maçãs Fuji**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2010.

SYAMALADEVI, R.M. Inactivation of *Escherichia coli* population on fruit surfaces using ultraviolet-C light: influence of fruit surface characteristics. **Food Bioprocess Technol**, 6, 2959-2973, 2013.

SYAMALADEVI, R. M. Surface decontamination of fresh-cut apple by UV-C light exposure: Effects on structure, colour and sensory properties. **Postharvest Biology and Technology**, 61, 165-171, 2011.

SYAMALADEVI, R. M. Ultraviolet-C light inactivation of *Penicillium expansum* on fruit surfaces. **Food Control**, 50, 297-303, 2015.

US-FDA (United States Food and Drug Administration). (2011). Ultraviolet radiation for the processing and treatment of food. Code of Federal Regulations, 179.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology** [online], v. 10, p. 175-177, 1993. Disponível em: <<https://goo.gl/K7fvfn>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

WHITING, R.C. Microbial modelling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467-494, 1995.

XU, X. M.;BERRIE, A. M. Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: a review. **Food Additives and Contaminants**, 22, 290-301, 2005.