

NATHÁLIA BUSS DA SILVA

MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE  
*Lactobacillus viridescens* SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS  
EM PRESUNTO FATIADO EMBALADO A VÁCUO

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi.

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

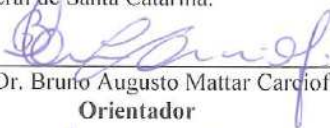
Florianópolis  
2015

**“MODELAGEM MATEMÁTICA DO  
CRESCIMENTO DE *Lactobacillus viridescens* SOB  
CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS EM PRESUNTO  
FATIADO EMBALADO A VÁCUO”**

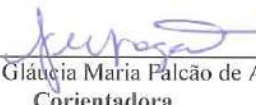
Por

**Nathália Buss da Silva**

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



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi  
**Orientador**

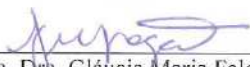


Profa. Dra. Gláucia Maria Pálção de Aragão  
**Orientadora**

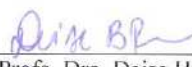


Prof. Dr. Marco Di Luccio  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**



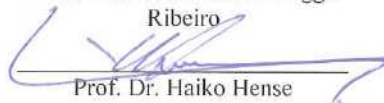
Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão  
de Aragão



Profa. Dra. Deise Helena Baggio  
Ribeiro



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior



Prof. Dr. Haiko Hense

**Florianópolis, 26 de março de 2015.**

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

Silva, Nathália Buss da  
Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado a vácuo / Nathália Buss da Silva ; orientador, Bruno Augusto Mattar Carciofi ; coorientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão. - Florianópolis, SC, 2015.  
89 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos.
2. Engenharia de Alimentos.
3. Microbiologia Preditiva.
4. *Lactobacillus*. I. Carciofi, Bruno Augusto Mattar. II. Aragão, Gláucia Maria Falcão de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Dedico este trabalho à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno, e minha coorientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia, pelos ensinamentos, pelas palavras de apoio nos momentos difíceis, mas acima de tudo, por acreditarem em mim e no meu trabalho. Aos professores Agenor, Deise e Haiko por participarem da defesa desta dissertação, enriquecendo o trabalho com suas contribuições.

À minha família, pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes em minha vida. Não há palavras que expressem minha gratidão a vocês. Em especial ao meu pai, que é minha maior fonte de inspiração e exemplo.

À minha irmã Priscila, pela sua sinceridade e por me ouvir nos momentos difíceis. Mesmo sem saber, sua presença diária foi muito importante.

Ao meu namorado Henrique por todo o carinho, companheirismo, paciência e força fundamentais em todos os momentos. Sua energia e alegria sempre me incentivam a buscar mais. Obrigada, também, por tornar esses últimos meses mais tranquilos do que eu imaginava.

À minha grande amiga Paulinha, que se faz presente em todos os momentos, tendo sempre uma palavra de conforto e sendo exemplo de dedicação e humildade. Às minhas queridas amigas Amanda e Indy, por todos os anos de amizade e companheirismo. É um grande presente tê-las por perto sempre que possível.

Ao Will, Natiele, Elisa e Ana por toda a ajuda na parte experimental e dedicação nos finais de semana e madrugadas. Ao Daniel pela ajuda nas simulações e paciência ao ensinar, sem as quais este trabalho não seria possível. Esta conquista também é de vocês!

Aos demais colegas do ENGEPIO e PROFI, pelas valiosas contribuições e pelos momentos de descontração compartilhados.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma e acreditaram na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são consideradas responsáveis pela deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo. A temperatura é um dos principais fatores que afetam a dinâmica microbiana e sua variação durante toda a cadeia de produção, distribuição e armazenamento de alimentos é significativa. Dessa forma, a utilização de modelos matemáticos capazes de descrever o comportamento microbiano considerando flutuações de temperatura pode ser muito útil na predição da vida útil de alimentos. O presente estudo avaliou o crescimento de *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto fatiado e embalado a vácuo e a capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts utilizando parâmetros obtidos isotermicamente em meio de cultura MRS. O presunto foi caracterizado pelo pH, atividade de água e concentração de cloreto de sódio, os quais encontravam-se dentro da faixa ótima de desenvolvimento de BAL. Para a obtenção do crescimento da BAL, a peça de presunto fresca foi esterilizada, fatiada, inoculada com a bactéria e armazenada em estufa com temperatura controlada. Para a construção dos modelos secundários foram utilizados parâmetros primários obtidos isotermicamente em MRS, mediante ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais de crescimento deste microrganismo. Para avaliar a interferência dos modelos secundários na predição foram estudadas duas abordagens de construção dos mesmos: geral e específica. Como não houve constatação de fase lag em meio de cultivo, para todas as condições testadas  $\lambda$  é nulo, o modelo da raiz quadrada foi selecionado para descrever a dependência do parâmetro  $\mu$  com a temperatura e o parâmetro  $y_{máx}$  foi representado por uma média, pois não sofreu significativa influência da temperatura. Os modelos matemáticos foram validados com dados de crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto sob seis condições diferentes de temperatura e sua capacidade de predição foi avaliada por meio de índices estatísticos, mostrando que a abordagem geral de construção dos modelos secundários apresentou melhor desempenho preditivo, principalmente em condições de temperatura crescente, onde a predição foi segura. O modelo validado pode ser utilizado para estimar a vida útil de produtos cárneos submetidos a diferentes condições de temperatura.

**Palavras-chave:** microbiologia preditiva, bactérias ácido lácticas, modelos não isotérmicos, produtos cárneos

## ABSTRACT

The lactic acid bacteria (LAB) are considered the main spoilage microorganisms of vacuum packed meat products. The temperature is the main factor that affect the microbial dynamics and its variation during the production, distribution and storage of foods is significant. Thus, the use of mathematical models to describe the microbial behavior under temperature fluctuations can be very useful in predicting the product shelf life. This study assessed the growth of *Lactobacillus viridescens* in sliced ham under non isothermal conditions and the predictive ability of the Baranyi and Roberts model using parameters obtained isothermally in MRS growth media. The ham was characterized by pH, water activity and sodium chloride concentration, which were within the optimum range of BAL development. To obtain the LAB growth, fresh ham was sterilized, sliced, inoculated with bacteria and stored in a temperature-controlled incubator. For the construction of the secondary models were used primary parameters obtained isothermally in culture medium by fitting the Baranyi and Roberts model to the microorganism growth experimental data. To assess the effect of secondary models in the prediction were studied two construction approaches: general and specific. Since there was no lag phase observation in culture medium for all tested conditions  $\lambda$  is null, the square root model was selected to describe the dependence of  $\mu_{\text{máx}}$  with temperature and  $y_{\text{máx}}$  was represented by an average because it did not show significant influence of temperature. The mathematical models were validated with *Lactobacillus viridescens* growth data in ham under six different conditions of temperature and its predictive ability were assessed by statistical index, showing that the general approach for construction of secondary models presented better predictive performance, particularly in increasing temperature conditions, when the prediction was safe. The validated model can be used to estimate meat products shelf life under different temperature conditions.

**Keywords:** predictive microbiology, lactic acid bacteria, non isothermal models, meat products

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de temperatura avaliadas. ....	39
Tabela 2 - Parâmetros de crescimento obtidos em meio de cultura MRS para <i>Lactobacillus viridescens</i> . Fonte: Camargo (2015). ....	43
Tabela 3 - Médias e desvios padrão das análises realizadas no presunto. ....	46
Tabela 4 - Modelos secundários resultantes da abordagem específica..	49
Tabela 5 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 8 °C. ....	51
Tabela 6 - Valores dos índices estatísticos para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 8 °C. ....	51
Tabela 7 - Índices estatísticos utilizados na avaliação da predição e do desempenho de cada abordagem do modelo secundário. ....	60
Tabela 8 - Vida útil observada e predita para as condições de temperatura avaliadas. ....	62
Tabela 9 – Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> ao longo do tempo para o experimento isotérmico a 8 °C. ....	76
Tabela 10 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 1 [NI-1] (4-8-12-16 °C). ....	77
Tabela 11 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 2 [NI-2] (12-16-20-25 °C)..	78
Tabela 12 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 3 [NI-3] (25-20-16-12-8-4 °C). ....	79
Tabela 13 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 4 [NI-4] (16-12-8-4 °C). ....	80
Tabela 14 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 5 [NI-5] (12-8-4-8-12 °C)...	81



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da temperatura de produtos refrigerados em toda a cadeia do frio. Adaptado de: HOANG et al., 2012. ....	23
Figura 2 - Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo. Adaptado de: Swinnen et al. 2004. ....	26
Figura 3 - Processo de fatiamento da peça de presunto. ....	37
Figura 4 - Fluxograma esquemático do preparo das amostras de presunto fatiado inoculado. ....	38
Figura 5- Fluxograma do procedimento de amostragem para a determinação da concentração celular. ....	41
Figura 6 - Fluxograma esquemático da modelagem matemática do crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> realizada no presente trabalho. ....	42
Figura 7- Modelo secundário (abordagem geral): Efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ). ....	48
Figura 8 - Gráfico de crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> a 8 °C e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto. ....	50
Figura 9 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-1 (4-8-12-16 °C). ....	53
Figura 10 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-2 (12-16-20-25 °C). ....	53
Figura 11 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-3 (25-20-16-12-8-4 °C). ....	54
Figura 12 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-4 (16-12-8-4 °C). ....	54
Figura 13 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-5 (12-8-4-8-12 °C). ....	55

Figura 14 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-6 (8 °C). .....	55
Figura 15 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e meio de cultivo MRS e predições geradas pelo modelo de Bananyi e Roberts, utilizando a abordagem geral de construção dos modelos secundários para NI-4 (16-12-8-4 °C). .....	58
Figura 16 - Crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> em presunto e meio de cultivo MRS e predições geradas pelo modelo de Bananyi e Roberts, utilizando a abordagem geral de construção dos modelos secundários para NI-5 (12-8-4-8-12 °C). .....	59
Figura 17 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-1. ....	82
Figura 18 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-1. ....	83
Figura 19 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-2. ....	83
Figura 20 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-2. ....	84
Figura 21 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-3. ....	84
Figura 22 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-4. ....	85
Figura 23 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-4. ....	85
Figura 24 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-5. ....	86

Figura 25 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-5. ....	86
Figura 26 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-6. ....	87
Figura 27 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-6. ....	87
Figura 28 - Modelo secundário (linear): efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ). ....	88
Figura 29 - Modelo secundário (exponencial): efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ). ....	89
Figura 30 - Modelo secundário (tipo Arrhenius): efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ). ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- b – Parâmetro empírico
- BAL – Bactérias ácido láticas
- BOD – Estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio
- cond – Condições ambientais
- Dp – Desvio padrão
- F(t) – Função de ajuste
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
- $h_0$  – Função de transformação do parâmetro  $q_0$
- L – Concentração de Cl
- m – Parâmetro de curvatura
- $m$  – Massa
- $M_{Cl}$  - Massa molar do cloreto
- $M_{NaCl}$  - Massa molar do cloreto de sódio
- Md – Média aritmética
- MRS – Meio de cultivo Man, Rogosa e Sharpe
- NaCl – Cloreto de sódio
- NI-1 – Condição não isotérmica 1 [4-8-12-16 °C]
- NI-2 – Condição não isotérmica 2 [12-16-20-25 °C]
- NI-3 – Condição não isotérmica 3 [25-20-16-12-8-4 °C]
- NI-4 – Condição não isotérmica 4 [16-12-8-4 °C]
- NI-5 – Condição não isotérmica 5 [12-8-4-8-12 °C]
- NI-6 – Condição 6 [8 °C]
- N – População microbiana
- $N_0$  – População microbiana inicial
- $N_{máx}$  – População microbiana máxima
- NC – Não calculado
- p – Parâmetro a ser descrito pelos modelos secundários
- q – Função do estado fisiológico das células
- $q_0$  – Estado fisiológico inicial da célula
- t – Tempo
- T – Temperatura
- $T_{mín}$  – Temperatura mínima de observação do crescimento
- UFC – Unidades formadoras de colônia
- V – Volume
- $x_{NaCl}$  – Concentração de cloreto de sódio
- $y_{máx}$  – Logaritmo natural da população microbiana máxima
- WHO - World Health Organization
- $\mu$  – Velocidade específica máxima de crescimento

$\mu_{lag}$  – Velocidade específica de crescimento (fase lag)

$\mu_{exp}$  – Velocidade específica de crescimento (fase exponencial)

$\mu_{est}$  – Velocidade específica de crescimento (fase estacionária)

$\lambda$  – Duração da fase lag

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo geral .....	17
1.1.2 Objetivos específicos .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Bactérias ácido láticas .....	19
2.2 Deterioração de produtos cárneos.....	20
2.3 Oscilações e abusos de temperatura na cadeia do frio - influência sobre o desenvolvimento microbiano .....	22
2.4 Microbiologia Preditiva.....	24
2.4.1 Modelos primários .....	25
2.4.2 Modelos secundários .....	29
2.4.3 Modelos Terciários .....	30
2.4.4 Validação .....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Caracterização do presunto.....	35
3.2 Microrganismo .....	36
3.3 Inóculo.....	36
3.4 Preparo das amostras .....	36
3.5 Condições de armazenamento das amostras.....	39
3.6 Amostragem – determinação da concentração celular ao longo do tempo .....	39
3.7 Modelagem matemática do crescimento microbiano .....	42
3.7.1 Ajuste primário .....	43
3.7.2 Modelos secundários .....	43

3.7.3 Predições.....	44
3.8 Análise estatística da predição – Validação do modelo.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4.1 Caracterização do presunto.....	46
4.2 Modelos secundários .....	47
4.2.1 Abordagem geral .....	47
4.2.1 Abordagem específica .....	48
4.3 Ajuste Primário.....	49
4.4 Avaliação da capacidade preditiva do modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts sob duas abordagens dos modelos secundários ...	52
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
ANEXO 1 – Dados experimentais de crescimento de <i>Lactobacillus viridescens</i> .....	76
ANEXO 2 – Gráficos: Valores preditos vs. Observados.....	82
ANEXO 3 – Modelos secundários avaliados .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são consideradas a principal causa de deterioração microbiana em produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (BORCH; KANT-MUEMANS; BLIXT, 1996; HUGAS, 1998). Uma das espécies mais frequentemente encontrada nesses produtos, de acordo com Morishita e Shiromizu (1986), é a *Lactobacillus viridescens*, microrganismo capaz de produzir peróxidos que reagem com os pigmentos característicos da carne, causando o esverdeamento superficial do produto.

Sendo a temperatura um dos principais fatores que afetam o crescimento bacteriano, a sua investigação durante o processamento, distribuição e armazenamento de alimentos perecíveis é de extrema importância, uma vez que podem ocorrer abusos de temperatura em toda a cadeia de produção e consumo. Devido a isso, a modelagem matemática do crescimento microbiano está sendo direcionada para a obtenção de modelos que descrevam ambientes não isotérmicos e que permitam prever a vida útil dos alimentos em condições reais (ROSS; McMEEKIN, 1994; GOUGOLI; KOUTSOUMANIS, 2010).

A grande vantagem da aplicação da microbiologia preditiva é que, ao contrário do método tradicional de armazenamento, o modelo, uma vez validado, pode ser utilizado para prever rapidamente e com confiança as respostas dos microrganismos sob uma variedade de condições, dentro dos limites estudados (McCLURE, 1994). Além disso, os métodos tradicionais, utilizados na determinação da vida útil de alimentos, não consideram flutuações de temperatura ao longo da cadeia de distribuição e armazenamento dos produtos, ou seja, simulam um ambiente ideal, que raramente acontece. Pequenos períodos de temperaturas elevadas podem deteriorar o produto cárneo, por isso tamanha a importância do estudo não isotérmico de crescimento de bactérias ácido lácticas.

A maior dificuldade da modelagem não isotérmica do crescimento microbiano é que são necessários experimentos isotérmicos a diferentes temperaturas, dentro de um intervalo pré-determinado, para obter uma estimativa confiável dos parâmetros primários de crescimento. Posteriormente, é necessária a construção de modelos secundários capazes de descrever a dependência dos parâmetros com a temperatura de forma confiável, para então ser possível simular o crescimento do microrganismo a temperaturas variáveis.



O presunto foi selecionado como meio de crescimento no presente trabalho por se tratar de um produto cárneo amplamente consumido, com longo prazo de validade quando comparado à carne fresca, e que necessita de refrigeração durante toda a cadeia de produção, distribuição e armazenamento. Além disso, muitas vezes a distância entre a produção e o consumo/venda do produto é longa, o que facilita a existência de abusos de temperatura, propiciando a rápida multiplicação de BAL na superfície do produto, que é a parte do alimento mais suscetível a oscilações de temperatura.

Sendo assim, a modelagem matemática do crescimento de *L. viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto a partir de parâmetros estimados em meio de cultura é de extrema importância na determinação da real vida útil de produtos cárneos refrigerados embalados a vácuo.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar o crescimento da cultura pura da bactéria ácido láctica *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto comercial fatiado embalado a vácuo e avaliar a capacidade preditiva de um modelo matemático que descreva este crescimento utilizando parâmetros obtidos em meio de cultivo sintético (MRS) sob condições isotérmicas.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Caracterizar o presunto utilizado como meio de crescimento de *Lactobacillus viridescens* quanto ao seu pH, atividade de água e concentração de cloreto de sódio;
- Estabelecer modelos secundários que descrevam a dependência dos parâmetros de crescimento primário, obtidos em meio de cultura MRS, com a temperatura, mediante duas abordagens;

- Avaliar a capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts para o crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto fatiado embalado a vácuo sob diferentes condições de temperatura variável e estabelecer a abordagem de construção dos modelos secundários com melhor desempenho preditivo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias ácido láticas (BAL) são um grupo de microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos e encontrados nas formas de cocos ou bacilos (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Possuem a característica de produzir ácido láctico através da fermentação de carboidratos e têm sido utilizadas para produzir alimentos fermentados há, pelo menos, 4000 anos (LEITE, 2006).

As BAL são tradicionalmente subdivididas em quatro gêneros: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Porém, segundo Ferreira (2003), são quinze os gêneros constituintes desse grupo: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*.

A primeira classificação conferida a essas bactérias foi fundamentada no isômero de ácido láctico produzido por elas durante a fermentação da glicose. Quando o ácido láctico apresenta rotação ótica para a esquerda ele é denominado Levorotatório (L), e quando apresentar rotação para a direita, ele é denominado Dextrorotatório (D), podendo ainda ser chamado de racêmico quando há mistura dos dois isômeros de ácido láctico (DL) (CARR et al., 2002).

Segundo CARR et al. (2002), as bactérias ácido láticas são, ainda, classificadas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com o produto final de sua fermentação. As bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como produto principal da fermentação de glicose. As heterofermentativas produzem outros produtos além de ácido láctico, que incluem dióxido de carbono, ácido acético e etanol.

Há um crescente interesse na utilização de BAL como agentes conservadores de alimentos, pois há décadas esses microrganismos são utilizados como inibidores de crescimento de patógenos, pelo fato de possuírem propriedades bactericidas (ENNAHAR ;SONOMOTO; ISHIZAKI, 1999). Segundo Ammor et al. (2006), os mecanismos utilizados pelas bactérias ácido láticas para interferir no crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes são, principalmente, competição

por oxigênio e produção de substâncias antagônicas, especialmente bacteriocinas.

Durante as últimas décadas, embalagens bioativas enriquecidas com metabólitos antimicrobianos, principalmente bacteriocinas, têm sido intensamente desenvolvidas (CAO-HOANG et al., 2010; NEETOO et al., 2008; SCANNELL et al., 2000). No entanto, a maior dificuldade encontrada é a diminuição da atividade antimicrobiana do filme ao longo do tempo (CONCHA-MEYER et al., 2011; KRISTO et al., 2008). A fim de resolver este problema, a incorporação direta de linhagens produtoras de bacteriocina, inclusive BAL, em matrizes poliméricas tem sido investigada (ISEPPI et al., 2011; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2013).

Apesar de possuírem propriedade antimicrobiana, as BAL são os principais agentes deteriorantes em determinados alimentos, tais como produtos embalados a vácuo, em atmosfera modificada e produtos cárneos processados armazenados à temperatura de refrigeração. A deterioração por essas bactérias é principalmente devido à produção de limo na superfície do produto, além da formação de metabólitos e *off-flavors*, que influenciam na aparência, textura e causam sabores e odores desagradáveis (CARR et al., 2002; NYCHAS et al., 2008).

## 2.2 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Em produtos cárneos, o ponto de deterioração pode ser definido por um nível tolerável de bactérias presentes, ocorrência de odores indesejáveis ou aparência inaceitável. A vida útil desses produtos depende do número e do tipo de microrganismos, na sua maioria bactérias, inicialmente presentes e seu crescimento subsequente. (BORCH et al., 1996).

A carne, por possuir pH próximo da neutralidade (faixa mais favorável para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos) é altamente suscetível à deterioração microbiana. A carne de frango, por exemplo, apresenta pH entre 6,2 e 6,4, enquanto alguns produtos cárneos cozidos, como o presunto, apresentam pH em torno de 6,2 (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Grande parte da flora bacteriana inicial encontrada em produtos cárneos está firmemente ligada à superfície (GILL, 1982). Quando se combina temperatura de refrigeração e condições de microaerofilia (embalagens a vácuo ou embalagens com atmosfera modificada) no armazenamento de processados cárneos, são as bactérias ácido lácticas

que irão predominar como deteriorantes daquele alimento. (VERMEIREN; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2004; BORCH et al., 1996). Segundo Franz e von Holy (1996), tal predominância se deve, também, ao fato das BAL serem resistentes ao sal e ao nitrito.

As espécies de BAL geralmente encontradas de forma natural em carnes e produtos cárneos são: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus curvatus* (HUGAS, 1998). Dentre essas, de acordo com Morishita e Shiromizu (1986), a espécie de *Lactobacillus* encontrada mais frequentemente em produtos cárneos é a *Lactobacillus viridescens*.

Também classificada como sendo do gênero *Weissella* (PATTERSON et al., 2010), a espécie *Lactobacillus viridescens* pode produzir peróxidos que reagem com os pigmentos dos produtos cárneos, causando o esverdeamento dos mesmos (MILBOURNE, 1983).

Silva (2013) avaliou o crescimento de BAL em linguiça frescal de frango em condições isotérmicas, sob diferentes concentrações de lactato de sódio e cloreto de sódio, com o objetivo de aumentar a vida útil do produto com base em uma formulação adequada que inibisse o crescimento desses microrganismos deteriorantes.

Na avaliação do crescimento bacteriano em presunto a temperaturas constantes, Slongo (2008) constatou que o parâmetro  $\mu_{\text{máx}}$  (velocidade específica máxima de crescimento) encontrado para contagem total e contagem de BAL foram  $0,314 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  e  $0,30 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ , respectivamente, mostrando claramente a forte predominância das bactérias ácido láticas sobre a deterioração do presunto.

Dalcanton (2010) estudou o crescimento de três espécies de BAL (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus sakei*) em condições de temperatura constante em meio de cultura MRS. Posteriormente, o desenvolvimento de *Lactobacillus plantarum* foi investigado em *chopped* suíno fatiado e embalado a vácuo, também em condições isotérmicas.

Patterson et al. (2010) avaliaram o crescimento de *Lactobacillus viridescens* em carne cozida de aves, pois esse foi o microrganismo deteriorante encontrado em maior quantidade no alimento, Milbourne (1983) estudou a termotolerância da *Lactobacillus viridescens* a processos de inativação microbiológica industriais em produtos cárneos e Franz e Holy (1996) estudaram a inativação térmica de uma combinação de BAL em salsichas. Estes pesquisadores concluíram que nem todos os processos térmicos utilizados industrialmente são efetivos na inativação deste grupo de microrganismos, sugerindo que a presença

natural dos mesmos é a principal fonte de contaminação e deterioração de produtos cárneos.

### 2.3 OSCILAÇÕES E ABUSOS DE TEMPERATURA NA CADEIA DO FRIO - INFLUÊNCIA SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO

A temperatura, o pH e a atividade de água são os principais fatores que influenciam a estabilidade microbiana em alimentos, sendo que a temperatura pode variar consideravelmente durante a cadeia de produção e distribuição (VAN IMPE et al., 1992).

Oscilações e abusos de temperatura podem ocorrer em qualquer ponto da cadeia de produção e distribuição de alimentos perecíveis, e também, após a compra do produto, no trajeto até as residências e no armazenamento doméstico (FU; TAOUKIS; LABUZA, 1991).

A cadeia de frio é definida como o conjunto de etapas de refrigeração que mantêm a qualidade e segurança do produto alimentar, desde a produção até o consumo. Apesar da refrigeração ser muito importante na manutenção da segurança e qualidade dos alimentos perecíveis, o seu funcionamento demanda muito em energia. Isso tem implicações econômicas para a indústria e comércio de alimentos, com os custos de eletricidade representando uma parte substancial dos custos totais de produção. (GWANPUA et al., 2015).

A fim de garantir a qualidade e segurança dos alimentos refrigerados desde a produção até o consumo, a eficiente gestão da cadeia de frio é de grande importância. Tal tarefa exige o conhecimento da evolução da temperatura do produto alimentício em toda a cadeia de frio que pode ser obtido por meio de investigação de campo ou por simulação numérica. (HOANG et al., 2012). A Figura 1 é um exemplo observado da evolução da temperatura de produtos refrigerados em toda a cadeia do frio.

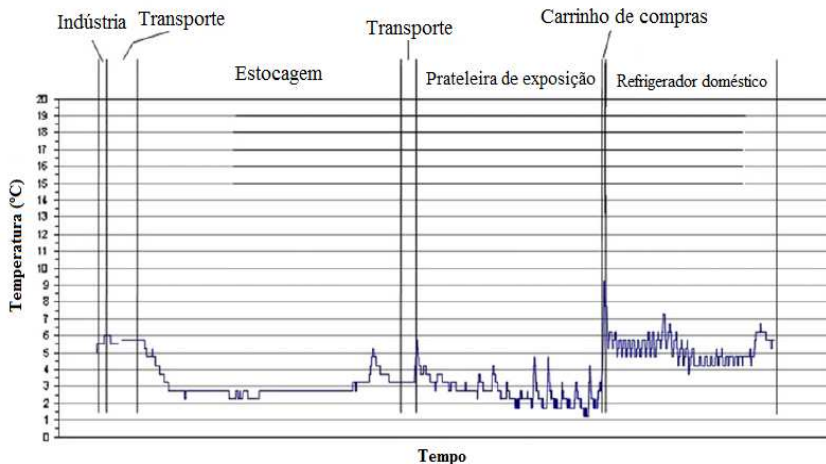


Figura 1 - Evolução da temperatura de produtos refrigerados em toda a cadeia do frio. Adaptado de: HOANG et al., 2012.

Ao analisar a Figura 1, pode-se facilmente perceber o quão essencial é a investigação e controle da temperatura durante todo o processo de produção, distribuição e armazenamento de produtos perecíveis. Caso contrário, pode ocorrer o rápido desenvolvimento microbiano, reduzindo a vida útil do produto e colocando em risco a saúde do consumidor, quando houver a presença e desenvolvimento de patógenos (MASSAGUER, 2005).

Ao estudarem o perfil de temperatura apresentado pela Figura 1, utilizando um modelo preditivo simplificado (capaz de descrever o crescimento conjunto de diversos microrganismos) e analisando cem mil produtos diferentes (com a mesma contaminação inicial), Hoang et al (2012) concluíram que: em 50% dos produtos houve um aumento da população em cerca de 3 vezes a concentração inicial – o que é considerado razoável, em 5% dos produtos houve avanço da população microbiana em 200 vezes e em 1% dos alimentos (o que representa mil unidades) o aumento populacional alcançou o nível de  $10^4$  vezes a população inicial, o que pode ocasionar a precoce deterioração do alimento e algum tipo de dano à saúde do consumidor.

De acordo com VALÍK et al. (1999), a microbiologia preditiva estuda o comportamento de microrganismos sob diferentes condições químicas, físicas e físico-químicas, tais como temperatura, atividade de

água, pH, entre outros. Tal estudo pode ajudar a identificar os pontos críticos do processo de produção e distribuição.

## 2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva pode ser definida como uma área de pesquisa que utiliza modelos matemáticos para descrever a dinâmica (crescimento e sobrevivência) populacional de microrganismos submetidos a complexas mudanças físicas, químicas e biológicas durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos (HUANG, 2014). Além disso, a microbiologia preditiva é considerada uma área multidisciplinar, já que compreende áreas da matemática, engenharia, química e biologia para fornecer prognósticos comportamentais em determinados alimentos sob condições definidas (SCHAFFNER; LABUZA, 1997; McDONALD; SUN, 1999).

O início da utilização de modelos matemáticos em microbiologia de alimentos aconteceu por volta de 1920, revolucionando a indústria de enlatados com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos (GOLDBLITH et al., 1961). Contudo, apenas a partir de 1983, o potencial da microbiologia preditiva começou a atrair interesse em termos de pesquisa e financiamento, principalmente nos Estados Unidos, Reino Unido, Austrália e Europa (ROSS, McMEEKIN, 1994).

Ainda segundo ROSS e McMEEKIN (1994), o interesse na utilização dos modelos ocorreu por duas razões: o aumento de casos importantes de intoxicação alimentar durante os anos 80, levando ao aumento da conscientização pública da necessidade da oferta de alimentos seguros e a constatação de muitos microbiologistas de que os métodos tradicionais na determinação de qualidade e segurança microbiológica eram limitados pelo tempo de obtenção de resultados, além de ter pequeno valor preditivo.

De acordo com Tijksens et al. (2001), as aplicações práticas da microbiologia preditiva começaram a se materializar somente nos anos 80, por causa de uma importante ferramenta utilizada nos dias de hoje, o computador. Para Whiting (1995), com o advento dos computadores pessoais, a modelagem microbiana tornou-se uma área de interesse crescente, já que os modelos poderiam ser facilmente utilizados por tecnólogos e microbiologistas de alimentos.

Whiting e Buchanan (1993) sugeriram a seguinte classificação para os modelos matemáticos utilizados em microbiologia preditiva:



*Modelos primários:* descrevem a resposta do microrganismo em relação ao tempo, para um conjunto de condições fixas. A resposta microbiana pode ser medida diretamente, pela densidade populacional (contagem de placas, microscopia, etc.), indiretamente (absorbância, impedância, etc.) ou por produtos do metabolismo microbiano (produção de ácido, síntese de toxinas, etc.).

*Modelos secundários:* descrevem a sensibilidade dos parâmetros do modelo primário em relação às mudanças nas condições de cultivo, como variações de temperatura, por exemplo.

*Modelos terciários:* acoplam modelos primários e secundários, com o objetivo de gerar previsões para condições ambientais variáveis. Estão, muitas vezes, disponíveis de forma didática em *softwares*.

Como descrito acima, os modelos primários e secundários são fundamentados em experimentos realizados a condições constantes. Porém, condições como temperatura e pH, por exemplo, nem sempre se mantêm constantes durante o processamento e armazenamento de alimentos. Por isso, nos últimos anos, o interesse por modelos terciários tem aumentado, ou seja, modelos que permitam prever o comportamento dos microrganismos submetidos a condições ambientais que variam como o tempo, principalmente sob condições não isotérmicas (MCMEEKIN et al., 2008).

#### 2.4.1 MODELOS PRIMÁRIOS

Os modelos primários descrevem o aumento na concentração de microrganismos em função do tempo, sob condições ambientais constantes. Basicamente, três parâmetros são utilizados para caracterizar uma curva de crescimento microbiano: duração da fase lag ( $\lambda$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ ), população máxima atingida ( $N_{m\acute{a}x}$ ) ou aumento logarítmico da população ( $N_{m\acute{a}x} - N_0$ ), onde  $N_0$  é a população inicial. Tais parâmetros, bem como as fases distintas do crescimento microbiano, que cada parâmetro representa, estão representados na Figura 2, onde  $N_{m\acute{a}x} = n_{m\acute{a}x}$ ,  $N_0 = n_0$  e  $\ln N =$  logaritmo natural da concentração celular.

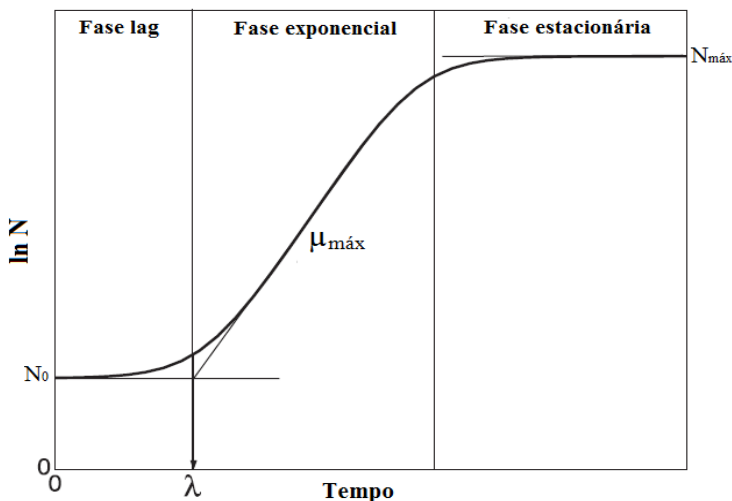


Figura 2 - Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo. Adaptado de: Swinnen et al. 2004.

A fase lag (representada pela letra grega  $\lambda$ ) é tipicamente observada como um atraso na resposta da população microbiana a uma súbita mudança no ambiente. É um período de ajuste, quando os microrganismos se adaptam a fim de obter as condições necessárias para crescer exponencialmente (SWINNEN et al., 2004).

A fase estacionária do crescimento microbiano é alcançada depois que a população microbiana deixa de crescer exponencialmente, onde a concentração máxima de células é atingida em determinado ambiente, sob determinadas condições (LONGHI, 2012).

Os modelos matemáticos de crescimento microbiano têm sua construção baseada em um bloco elementar que descreve a evolução da população através de uma equação diferencial de primeira ordem (BERNAERTS et al., 2004), conforme apresentado na Equação (1):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t, N, \text{cond}) N(t) \quad (1)$$

sendo que  $N(t)$  é a contagem da população no instante  $t$  e  $\mu(t)$  é a velocidade específica de crescimento da população, que depende do conjunto de condições ambientais ( $\text{cond}$ ) a que a população é

submetida, além de fatores intrínsecos à própria população (LONGHI, 2012).

Segundo Van Impe et al. (2005), a velocidade de crescimento global da Equação (1) pode ser representada por três fatores que descrevem as três fases de crescimento, conforme a equação (2):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{lag}\mu_{exp}\mu_{est}N(t) \quad (2)$$

sendo que o fator  $\mu_{lag}$  é introduzido para descrever o comportamento da fase lag (função de ajuste), o fator  $\mu_{exp}$  é a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ ), e o fator  $\mu_{est}$  introduz o decréscimo gradual na velocidade específica de crescimento, resultando na fase estacionária (função de inibição) (BERNAERTS et al., 2004; LONGHI, 2012).

Entre os modelos primários comumente utilizados na literatura para descrever o crescimento de microrganismos, está o modelo de Baranyi e Roberts, que será brevemente descrito a seguir.

#### 2.4.1.1 O MODELO DE BARANYI E ROBERTS

A função de ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994) [F(t)], apresentada pela Equação (3) procura descrever o mecanismo biológico envolvido na evolução do estado fisiológico das células ao novo ambiente.

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln \left( \frac{\exp(-\mu t) + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (3)$$

onde  $q_0$  representa o estado fisiológico inicial da célula e  $\mu$  é a velocidade específica máxima de crescimento

A função de inibição, descrita pela Equação (4), não apresenta mecanismo biológico envolvido.

$$\mu_{est} = 1 - \left( \frac{N(t)}{N_{m\acute{a}x}} \right)^m \quad (4)$$

onde  $N$  é a população microbiana em determinado tempo  $t$ ;  $N_{\text{máx}}$  é a população máxima atingida e  $m$  é um parâmetro de curvatura.

Considerando as Equações (3) e (4) e as condições ambientais constantes, o modelo proposto por Baranyi e Roberts (1994) é construído, sendo apresentado pela Equação (5).

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu F(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{\exp(m\mu F(t)) - 1}{\exp(m(\ln(N_{\text{máx}}/N_0)))} \right) \quad (5)$$

onde  $N_0$  é a população inicial e  $\mu$  é a velocidade específica máxima de crescimento.

Segundo Longhi (2012), o parâmetro  $m$  não melhora de forma significativa a qualidade dos ajustes, na maioria dos casos. Seguindo as recomendações de Baranyi (1997), é possível considerá-lo igual a um. Dessa forma, a Equação (5) se torna a Equação (6) abaixo.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu F(t) - \ln \left( 1 + \frac{\exp(\mu F(t)) - 1}{\exp(\ln(N_{\text{máx}}) - \ln(N_0))} \right) \quad (6)$$

Os autores do modelo recomendam, ainda, a transformação do parâmetro  $q_0$  no parâmetro  $h_0$  através da Equação (7), a fim de tornar o ajuste da equação aos dados experimentais mais estável.

$$h_0 = \ln \left( 1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (7)$$

sendo que  $h_0$  se relaciona com a duração da fase lag ( $\lambda$ ) através da Equação (8).

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu} \quad (8)$$

O valor de  $h_0$  é geralmente tomado como uma constante quando o ambiente e as condições de pré-inoculação das células são padronizados (DALCANTON, 2010).

Considerando a Equação (7), a função de ajuste  $F(t)$  pode ser descrita conforme a Equação (9).

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu} \ln(\exp(-\mu t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu t - h_0)) \quad (9)$$

Um importante conceito introduzido por esse modelo é a consideração do estado fisiológico inicial das células. Se a adaptação do microrganismo ao novo ambiente for lenta, a fase lag será estendida. Assim que as células se adaptarem ao novo ambiente, elas crescerão de forma exponencial até atingir a fase estacionária, que será alcançada quando houver restrições no meio de crescimento (BARANYI e ROBERTS, 1994; McKELLAR e LU, 2004).

A popularidade do modelo de Baranyi e Roberts, além de ser atribuída à sua flexibilidade e facilidade de utilização, se deve, em grande parte, ao desenvolvimento, pelos próprios autores e colaboradores, do DMFit, macro do *software* Microsoft Office Excel<sup>®</sup>, disponível de forma gratuita no site *Combase* ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)).

#### 2.4.2 MODELOS SECUNDÁRIOS

Qualquer equação que representar a variação dos parâmetros do modelo primário em função da variável ambiental (a temperatura, por exemplo) de forma satisfatória pode ser classificada como modelo secundário, caracterizando estes modelos, quase sempre, como empíricos. Corradini e Peleg (2005) têm demonstrado que modelos empíricos podem ser utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura e outros fatores, como atividade de água, pH, concentração de sal, etc.

Existem alguns modelos secundários pré-estabelecidos muito utilizados na literatura, particularmente quando a temperatura é o fator primário de interesse, tal como o modelo da raiz quadrada, proposto por Ratkowsky et al. (1982) (McMEEKIN et al., 1993; SARMENTO, 2006), caracterizado pela Equação (10).

$$\sqrt{p} = b(T - T_{\text{mín}}) \quad (10)$$

onde  $p$  é o parâmetro de interesse ( $\mu$ , por exemplo);  $b$  é parâmetro de inclinação empírico e  $T_{\text{mín}}$  é a temperatura mínima onde se observa crescimento microbiano (também obtida empiricamente).

Para Corradini (2006), mais importante do que usar um modelo tradicional é encontrar uma equação, ainda que empírica, que represente a influência do fator ambiental sobre os parâmetros de crescimento microbiológico.

Em alguns casos, a população máxima atingida é independente da temperatura, sendo possível perceber um baixo desvio padrão da média, principalmente nos casos em que o intervalo de temperatura avaliado é favorável ao crescimento do microrganismo (LONGHI, 2012). Tal comportamento foi observado por Camargo (2015) na descrição da sensibilidade do parâmetro  $y_{\text{máx}} [\ln(N_{\text{máx}})]$  com a temperatura, na avaliação do crescimento de *Lactobacillus viridescens*.

Dalcanton (2010), Ferreira (2004) e Camargo (2015), ao avaliarem o crescimento de BAL a diferentes temperaturas, encontraram no modelo da raiz quadrada o melhor ajuste para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro  $\mu$ .

### 2.4.3 MODELOS TERCIÁRIOS

A capacidade descritiva dos modelos primários pode ser garantida apenas para condições ambientais constantes. Portanto, é necessária a utilização de outras abordagens para prever o crescimento de microrganismos em condições de temperatura variável (LONGHI, 2012).

Para a modelagem do crescimento microbiano em condições ambientais variáveis, Van Impe et al. (1992) sugeriram uma abordagem na qual os modelos primários são utilizados como equações diferenciais de primeira ordem, onde os parâmetros desses modelos tornam-se funções das variações ambientais, descritas por modelos secundários. Assim, o modelo leva em consideração a variação dos fatores ambientais com o tempo, e torna-se análogo ao modelo primário quando as condições ambientais são constantes, sendo que, quando a temperatura é o fator ambiental que tem maior influência no crescimento

microbiano, outros fatores (como pH ou atividade de água) podem ser considerados constantes (LONGHI, 2012).

Para a predição do crescimento microbiano em condições não isotérmicas, através do modelo de Baranyi e Roberts, são utilizadas as Equações (11) e (12).

$$\frac{d(\ln(N(t)))}{dt} = \mu \left[ \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] \left[ 1 - \exp(\ln(N(t)) - \ln(N_{\text{máx}})) \right] \quad (11)$$

$$\frac{d(\ln(q(t)))}{dt} = \mu \quad (12)$$

Onde  $\mu$  e  $\ln(N_{\text{máx}})$  são funções da temperatura, descritos por modelos secundários. As condições iniciais para resolução das equações diferenciais (11) e (12) são apresentadas nas Equações (13) e (14).

$$\ln(N(t = 0)) = \ln(N_0) \quad (13)$$

$$\ln(q(t = 0)) = \ln(q_0) \quad (14)$$

Sendo que  $q_0$  se relaciona com o parâmetro  $h_0$  através da Equação (15).

$$\ln(q_0) = -\ln(\exp(h_0) - 1) \quad (15)$$

Os modelos que foram desenvolvidos baseados em equações que tentam descrever os mecanismos de desenvolvimento microbiano até certo nível de profundidade em relação à bioquímica envolvida ou incluem parâmetros interpretáveis (como é o caso do modelo de Baranyi e Roberts), acabam por serem mais genéricos e confiáveis quando usados para testar hipóteses e/ou previsões em condições diferentes, mas dentro do intervalo considerado para o desenvolvimento do modelo (GWANPUA et al., 2015).

#### 2.4.4 VALIDAÇÃO

Segundo McCLURE et al. (1994), para que os modelos preditivos possam ser aplicados, é de fundamental importância que estes sejam validados. Para isso, dois passos devem ser seguidos:

*Validação interna:* garante que o modelo descreve com precisão os dados experimentais que os originaram;

*Validação externa:* compara as predições com outros dados gerados por laboratórios/indústrias em diferentes meios/alimentos, ou ainda, utilizando dados da literatura.

Além disso, a utilidade de um determinado modelo preditivo está sujeita aos limites de investigação em que eles foram gerados. Assim, pode ser necessário considerar o efeito de condições extremas de armazenamento sobre a vida útil do produto, no caso de longos e “irrealísticos” tempos a altas temperaturas ocorrerem (WHO; FAO, 2008).

As predições geradas pelo modelo dificilmente irão perfeitamente representar a realidade, pois cada etapa do processo de construção do modelo introduz algum erro, como descrito abaixo (ROSS et al, 1999; CULLEN e FREY, 1999).

*Homogeneidade:* a maioria dos alimentos não são homogêneos. Modelos de microbiologia preditiva atuais não são capazes de prever/descrever a não homogeneidade dos alimentos;

*Integralidade:* o modelo é uma simplificação e outros efeitos sobre os alimentos e a ecologia microbiana (como estrutura, concorrência, entre outros), que são difíceis de quantificar, não estão incluídos nos modelos atualmente disponíveis.

*Função de erro do modelo:* é semelhante à integridade de erro, e decorre, principalmente, do compromisso feito quando se usa modelos empíricos, ou seja, que o modelo é apenas uma aproximação à realidade.

*Erro de medição:* se origina na imprecisão e nas limitações dos métodos de medição utilizados para coletar dados brutos que são, posteriormente, utilizados para estimar os parâmetros de um modelo;

*Procedimento numérico:* inclui todos os erros decorrentes de procedimentos utilizados para os ajustes do modelo, alguns dos quais são apenas métodos que simulam uma aproximação (WHO; FAO, 2008).

A aplicação de análises estatísticas apropriadas permite uma avaliação adequada da capacidade de predição do modelo que está sendo validado. Os índices estatísticos mais utilizados atualmente são: fator



bias (fator de tendência), fator de exatidão (ou *accuracy*) e RMSE (raiz do erro quadrático médio), descritos no item 3.9.

Para validar modelos de crescimento microbiológico em presunto e disponibilizar as informações no *software* FRISBEE ([www.frisbee-project.eu](http://www.frisbee-project.eu)), Gogou et al. (2015) realizaram pesquisa de campo, acompanhando um perfil de temperatura real e coletando amostras aleatórias em tempos determinados. Primeiramente, eles constataram que as BAL eram as principais responsáveis pela deterioração do produto e, posteriormente, realizaram experimentos isotérmicos para determinar a vida útil do produto a diferentes temperaturas. Por último, modelos secundários foram construídos e inseridos dentro de um modelo preditivo do tipo “caixa preta”, com o objetivo de que o utilizador do *software* possa simular a vida útil deste alimento sob diferentes condições de temperatura.

A utilização de modelos de crescimento microbiano desenvolvidos em meio de cultivo para prever o que acontece em alimentos é uma abordagem amplamente utilizada. Antolinos et al. (2012) conseguiram prever o crescimento de *Bacillus weihenstephanensis* em sopa de cenoura e macarrão cremoso sob diferentes condições de temperatura mediante modificação das características físico-químicas (atividade de água e pH) do meio modelo (caldo infusão de cérebro e coração (BHI)). Manios et al. (2014) estudaram o crescimento de bactérias ácido lácticas sob condições de temperatura variável e concluíram que os modelos desenvolvidos em meio de cultivo (MRS) podem prever o crescimento destes microrganismos em molhos de base vegetal. Kapetanakou et al. (2011) modelaram o crescimento de *Aspergillus carbonarius* em Caldo Extrato de Malte com diferentes atividades de água e concentrações de sólidos e conseguiram prever o desenvolvimento deste microrganismo em geleias.

O grupo de pesquisa em Microbiologia Preditiva do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC vem desenvolvendo algumas pesquisas a respeito do crescimento de bactérias ácido lácticas sob condições isotérmicas e não isotérmicas. Sarmento (2006) estudou o crescimento de BAL (flora natural) em mortadela sob condições não isotérmicas, predizendo o crescimento a partir de modelos obtidos isotermicamente em meio de cultura MRS. Dalcanton (2010) modelou o crescimento de *Lactobacillus plantarum* sob condições isotérmicas em meio de cultivo MRS, obtendo bons resultados na predição do crescimento do mesmo microrganismo em *chopped* suíno. Ambos os trabalhos concluíram que modelos

secundários, capazes de descrever os parâmetros obtidos em meio de cultura sob condições isotérmicas, são capazes de descrever o crescimento do microrganismo estudado em condições de temperatura variável, quando utilizados juntamente com um modelo preditivo adequado. Camargo (2015) estudou o crescimento de *Lactobacillus viridescens* em meio de cultivo MRS sob condições isotérmicas e Martins (2015) modelou o crescimento deste microrganismo sob condições de temperatura variável, também em meio de cultivo MRS, utilizando o modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts para obter predições do crescimento microbiano. Nesse contexto, o presente estudo foi realizado com a cepa pura de *Lactobacillus viridescens*, para avaliar seu crescimento sob condições não isotérmicas em presunto esterilizado (como forma a garantir que não houve interferência de outros microrganismos), com a finalidade de obter predições a partir dos resultados obtidos por Camargo (2015).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRESUNTO

Com o objetivo de caracterizar o presunto utilizado nos experimentos, análises de atividade de água, pH e concentração de cloretos (para posterior cálculo da concentração de cloreto de sódio) foram realizadas em cada peça de presunto utilizada. Todas as análises foram realizadas a temperatura de 23 °C, no mesmo dia de abertura da embalagem e em triplicada, retirando-se duas amostras de extremidades diferentes e uma do meio da peça.

Para as análises de atividade de água, aproximadamente 2,5 g de cada parte da peça de presunto levemente triturado foram colocadas em recipiente próprio para leitura no aparelho de atividade de água (Aqualab, modelo SERIES 3TE), previamente calibrado. A resolução do equipamento é de 0,001.

O pH do presunto foi medido em três diferentes pontos de cada amostra utilizando um pHmetro para sólidos (TESTO, modelo 205), previamente calibrado, com resolução de 0,01.

A determinação da concentração de cloreto de sódio (NaCl) no presunto foi feita mediante análise da concentração total de cloretos e posterior conversão, segundo metodologia proposta por Aliño et al. (2011).

Para a realização da medida de concentração de cloretos, foram homogeneizadas 2 g de cada amostra previamente triturada com água destilada em um homogeneizador Ultra Turrax (IKA, modelo T25 Digital) a 20.000 rpm por um minuto. Em seguida, a solução obtida foi transferida para um balão volumétrico, sendo o volume de 100 mL completado com água destilada. Essa solução foi, então, centrifugada (Centrífuga Sigma, modelo 4k15) a 9.000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi analisada em analisador automático de cloretos (Cole Parmer, modelo 926), previamente calibrado. Os resultados foram obtidos em miligramas de Cl por litro de solução, sendo a resolução do equipamento de 1 [mg/L]. A partir desse valor, foi calculada a concentração de NaCl na amostra de acordo com a Equação (16).

$$x_{\text{NaCl}} = \left(\frac{L V}{m}\right) \left(\frac{M_{\text{NaCl}}}{M_{\text{Cl}}}\right) 100 \quad (16)$$

onde  $x_{NaCl}$  é a concentração de cloreto de sódio (g NaCl/100g presunto),  $L$  é a leitura fornecida pelo equipamento (em g Cl/L de solução),  $V$  é o volume (em L) da solução (amostra + água destilada),  $m$  é a massa da amostra (em g),  $M_{NaCl}$  é a massa molar do cloreto de sódio (58,44 g/mol) e  $M_{Cl}$  é a massa molar do cloreto (35,45 g/mol).

### 3.2 MICRORGANISMO

Foi utilizada a bactéria ácido láctica (BAL) da espécie *Lactobacillus viridescens* (CCT 5843 ATCC 12706) adquirida na forma liofilizada da coleção de culturas da Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, Brasil). As cepas foram reidratadas conforme indicação e cultivadas em meio de cultivo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) (Difco Laboratories, Detroit, EUA), sendo mantidas estocadas em microtubos de polipropileno com meio MRS e 20% de glicerol a - 24°C, até a utilização.

### 3.3 INÓCULO

O preparo do inóculo foi feito por meio da reativação da cepa congelada em caldo MRS a 30 °C por 18 h, tempo médio necessário para a concentração de  $10^9$  UFC/mL ser atingida. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e colocada em um tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultivo MRS, atingindo a concentração de  $10^8$  UFC/mL. Mais uma diluição é realizada, obtendo a concentração de  $10^7$  UFC/mL. Foram transferidos, então, 2 mL dessa diluição para um erlenmeyer contendo 320 mL de caldo MRS, atingindo a concentração final de aproximadamente  $6 \times 10^4$  UFC/mL.

### 3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

As peças de presunto (Seara, sem capa de gordura) utilizadas nos experimentos eram frescas (no máximo 20 dias após a fabricação), e estavam armazenadas a 4 °C. Foram fatiadas utilizando o fatiador de frios (Metvisa, modelo CFIE 250) em câmara de fluxo (Figura 3), mediante ajuste de espessura da fatia para 1,5 mm. Antes do fatiamento, a câmara de fluxo e o fatiador foram higienizados com álcool 70% (v/v) e submetidos à luz UV por 15 minutos. As embalagens das peças de

presunto foram abertas de forma asséptica dentro da câmara de fluxo, as amostras para as análises físico-químicas foram retiradas e a superfície da peça foi esterilizada com álcool 70% (v/v) antes do fatiamento.



Figura 3 - Processo de fatiamento da peça de presunto.

Após o fatiamento, 1 mL do inóculo foi superficialmente espalhado em uma fatia, sendo uma segunda fatia colocada sobre a superfície inoculada, de forma que o inóculo ficou acomodado entre as duas fatias, totalizando 20 g de presunto em cada amostra, aproximadamente.

Cada amostra foi duplamente embalada, sendo ambas as embalagens plásticas e transparentes. A embalagem primária (que entra em contato direto com o presunto) foi um saco plástico estéril de homogeneização com capacidade para 400 mL, o qual foi dobrado e colocado dentro da embalagem secundária, uma “stand-up” própria para alimentos refrigerados. A embalagem secundária foi, então, selada a vácuo (Selovac, modelo 200b) e as amostras submetidas às diferentes condições de armazenamento, que serão descritas no item 3.5. Além disso, foram preparadas amostras não inoculadas, para verificar a esterilização da peça de presunto e acompanhar um possível crescimento de outras espécies de BAL (naturalmente presentes no presunto) ao longo do armazenamento.

O fluxograma da Figura 4 mostra, de forma simplificada, a metodologia adotada no preparo das amostras de presunto fatiado e inoculado.

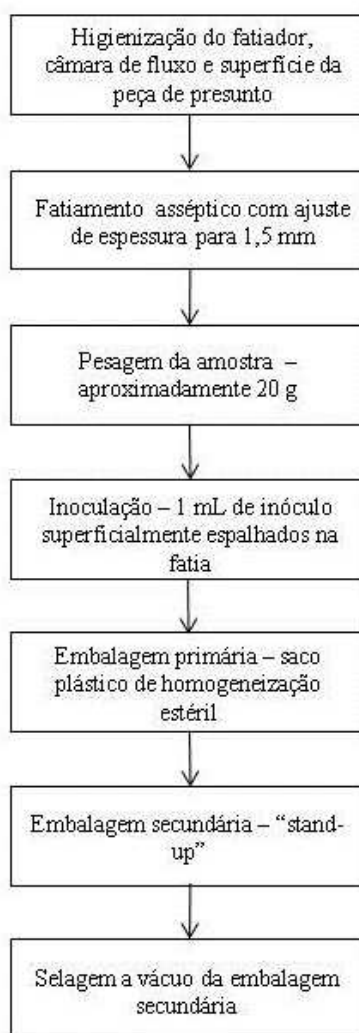


Figura 4 - Fluxograma esquemático do preparo das amostras de presunto fatiado inoculado.

### 3.5 CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Após a selagem a vácuo das embalagens contendo presunto fatiado inoculado, as amostras foram incubadas em estufa incubadora (B.O.D), sendo a temperatura do ambiente interno desta estufa registrada em *datalogger* previamente calibrado (com resolução de 0,1 °C), a cada cinco minutos. O *datalogger* foi posicionado no meio da prateleira superior da incubadora, onde as amostras foram incubadas.

O crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto fatiado embalado a vácuo foi avaliado em seis condições, uma delas na temperatura de 8 °C e cinco condições não isotérmicas, cujos valores programados de temperatura estão apresentados na Tabela 1. As variações de temperatura foram selecionadas procurando simular falhas ao longo da preservação refrigerada do presunto, além de considerar o aumento e a redução da temperatura ao longo da vida útil do produto.

Tabela 1 - Condições de temperatura avaliadas.

Condições	Tempo e temperatura de armazenamento (° C)
NI-1	<b>4 °C</b> [63,0 h], <b>8 °C</b> [28,6 h], <b>12 °C</b> [13,4 h], <b>16 °C</b> [63,0 h]
NI-2	<b>12 °C</b> [20,1 h], <b>16 °C</b> [11,9 h], <b>20 °C</b> [7,8 h], <b>25 °C</b> [20,2 h]
NI-3	<b>25 °C</b> [4,3 h], <b>20 °C</b> [6,5 h], <b>16 °C</b> [9,9 h], <b>12 °C</b> [16,7 h], <b>8 °C</b> [34,2 h], <b>4 °C</b> [96,4 h]
NI-4	<b>16 °C</b> [11,9 h], <b>12 °C</b> [20,1 h], <b>8 °C</b> [41,0 h], <b>4 °C</b> [119,1 h]
NI-5	<b>12 °C</b> [16,7 h], <b>8 °C</b> [34,2 h], <b>4 °C</b> [104,6 h], <b>8 °C</b> [34,2 h], <b>12 °C</b> [58,33 h]
NI-6	<b>8 °C</b> [384h]

### 3.6 AMOSTRAGEM – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR AO LONGO DO TEMPO

Em tempos pré-determinados, duas amostras (duplicata) foram retiradas da B.O.D para a determinação da concentração celular de *Lactobacillus viridescens* no presunto. Como as embalagens de homogeneização foram acondicionadas juntamente com o presunto, bastou água peptonada (1%) na proporção 9:1 (volume de água peptonada (mL)/massa de presunto(g)) e homogeneizar por 60 segundos em stomacher (ITR, modelo 1204) para realizar a primeira diluição. As

diluições seguintes foram feitas transferindo 1 mL da diluição anterior para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, e assim sucessivamente. Na sequência, 1 mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri estéreis e descartáveis, previamente identificadas, sendo colocada dupla camada de Agar MRS (Difco Laboratories, Detroit, EUA) para criar ambiente microaerófilo, ideal para o crescimento de BAL. Após a solidificação das camadas de Agar MRS (Difco Laboratories, Detroit, EUA), as placas invertidas foram incubadas a 30 °C por 48 h. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo previamente higienizada com álcool 70% (v/v) e submetida à luz UV por 15 minutos.

A contagem foi realizada nas placas com colônias desenvolvidas entre 25 a 250. Para o cálculo da população microbiana ( $N$ ), em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de presunto, multiplicou-se a contagem das placas pelo inverso da sua respectiva diluição. Os dados foram tratados e apresentam-se em gráficos do logaritmo natural da concentração de células ( $\ln(N)$ ) em função do tempo de incubação ( $t$ ).

O fluxograma representado pela Figura 5 é um esquema simplificado do procedimento descrito acima.



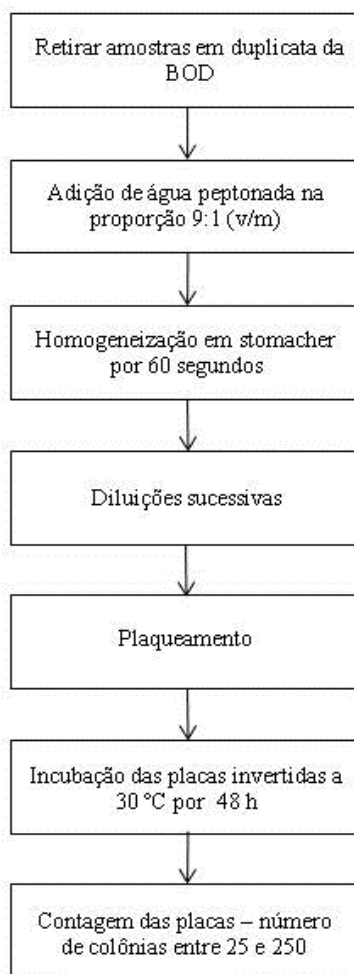


Figura 5- Fluxograma do procedimento de amostragem para a determinação da concentração celular

### 3.7 MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

A modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* está representada, de forma simplificada, na Figura 6. Além dos procedimentos descritos no esquema, foi realizado um experimento isotérmico a 8 °C em presunto, detalhadamente apresentado no item 3.8.1.

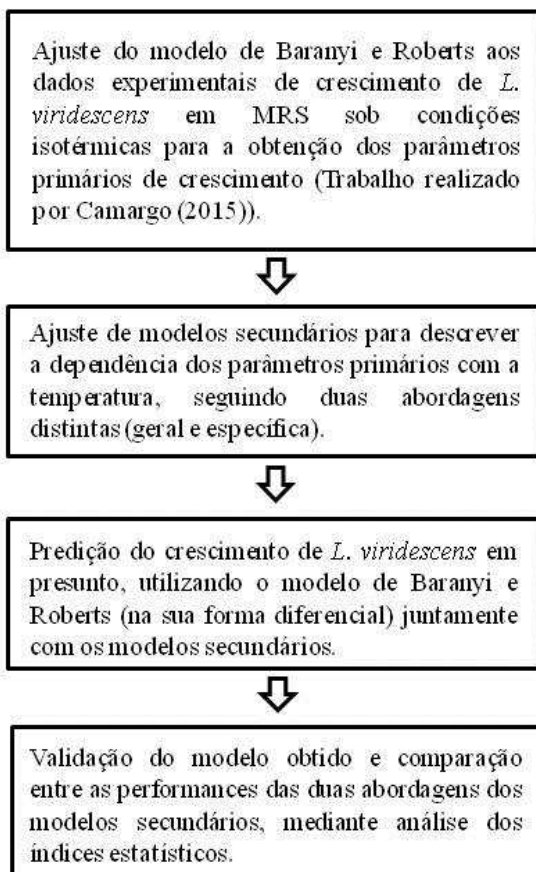


Figura 6 - Fluxograma esquemático da modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* realizada no presente trabalho.

### 3.7.1 AJUSTE PRIMÁRIO

Para a modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto sob condições isotérmicas, o modelo de Baranyi e Roberts, descrito pela Equação (6) foi selecionado para ser ajustado aos dados experimentais, tendo seus parâmetros estimados para a temperatura de 8 °C. O ajuste foi realizado no *software* Matlab 7 (MathWorks®, Natick, USA), utilizando a função de ajuste *fit*.

Estatisticamente, o ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts foi avaliado por meio do R<sup>2</sup> (coeficiente de correlação), RMSE (raiz do erro médio quadrático), fator bias e fator de exatidão, sendo os três últimos descritos no item 3.9. O R<sup>2</sup> é uma medida proporcional explicada pela equação ajustada em relação à variação total das respostas.

### 3.7.2 MODELOS SECUNDÁRIOS

Os modelos secundários utilizados no presente trabalho para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento do modelo primário ( $\lambda$ ,  $\mu$  e  $y_{\text{máx}}$ ), foram obtidos por meio dos dados de crescimento isotérmico de *Lactobacillus viridescens* em meio de cultivo MRS por Camargo (2015), apresentados na Tabela 2, sendo  $y_{\text{máx}} = \ln(N_{\text{máx}})$ .

Tabela 2 - Parâmetros de crescimento obtidos em meio de cultura MRS para *Lactobacillus viridescens*. Fonte: Camargo (2015).

Temperatura (°C)	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	$y_{\text{máx}}$
	[Md ± Dp]	[Md ± Dp]
4	0,022 ± 0,000	19 ± 0
8	0,062 ± 0,010	21 ± 0
12	0,16 ± 0,01	21 ± 0
16	0,25 ± 0,01	22 ± 0
20	0,43 ± 0,02	22 ± 0
30	0,78 ± 0,05	22 ± 0

Camargo (2015) não observou fase lag em seus experimentos isotérmicos, assim, o parâmetro  $\lambda$  foi considerado igual a zero no presente trabalho, bem como o valor de  $h_0$ .

Duas abordagens foram avaliadas na construção dos modelos secundários:

*Abordagem geral:* todas as temperaturas avaliadas por Camargo (2015) foram consideradas. Optou-se por considerar  $y_{\text{máx}}$  constante e igual à média aritmética dos valores observados em cada temperatura, pois essa tem sido uma abordagem amplamente utilizada em microbiologia preditiva, ou seja, a população máxima atingida por determinado microrganismo em determinado meio independe da temperatura.

*Abordagem específica:* apenas as temperaturas de cada experimento foram consideradas. Nesse caso,  $y_{\text{máx}}$  foi calculado mediante média ponderada com o tempo em que cada temperatura foi mantida, até o primeiro ponto experimental de observação da fase estacionária do crescimento microbiano. Como não há experimento isotérmico realizado à temperatura de 25 °C, quando essa temperatura fez parte do experimento não isotérmico, os parâmetros foram avaliados a temperatura de 30 °C.

O modelo da raiz quadrada, descrito pela Equação (10) foi utilizado para descrever a influência da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ).

Como experimento NI-6 foi realizado à temperatura constante de 8 °C, a construção dos modelos secundários considera apenas os parâmetros obtidos em meio de cultura MRS por Camargo (2015) a esta temperatura.

### 3.7.3 PREDIÇÕES

As predições foram realizadas utilizando o modelo de Baranyi e Roberts na sua forma diferencial, segundo as equações (11) e (12) e com as condições iniciais (13) e (14), juntamente com os modelos secundários, em *software* Matlab 7 (MathWorks®, Natick, USA), utilizando a função ode23. O perfil de temperatura a que as amostras foram submetidas foi adquirido por meio dos dados gravados em *datalogger*.

A escolha do modelo de Baranyi e Roberts foi baseada na pesquisa desenvolvida por Camargo (2015), que obteve seu melhor resultado com o crescimento de *Lactobacillus viridescens* em meio de cultura mediante o ajuste desse modelo aos dados experimentais obtidos isotermicamente, a diferentes temperaturas.

Sendo assim, para cada condição de temperatura avaliada, foram obtidas duas predições geradas pelo modelo de Baranyi e Roberts. Uma

utilizando a abordagem geral dos modelos secundários e outra utilizando a abordagem específica.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PREDIÇÃO – VALIDAÇÃO DO MODELO

A avaliação da capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts foi realizada através de três índices estatísticos: fator bias, fator de exatidão e RMSE (raiz quadrada do erro médio quadrático), caracterizados pelas Equações (17), (18) e (19), respectivamente. Sendo assim, quando cada abordagem dos modelos secundários foi adotada, houve uma análise da capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts para cada perfil de temperatura estudado.

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}})}{n}\right)} \quad (17)$$

$$\text{fator de exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\text{valor}_{\text{predito}}/\text{valor}_{\text{observado}})|}{n}\right)} \quad (18)$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\text{valor}_{\text{observado}} - \text{valor}_{\text{predito}})^2}{n}} \quad (19)$$

nas quais  $n$  é o número de pontos experimentais.

Os fatores bias e exatidão, introduzidos por Ross (1996) para a avaliação do desempenho de modelos em microbiologia preditiva, são apurados ao basear o cálculo na média das diferenças quadradas entre previsões e observações. O uso desses índices é estendido por apresentar mecanismos que permitem a avaliação da diferença entre a predição gerada pelo modelo e os dados experimentais de crescimento de um organismo de interesse ao longo de diferentes fatores ambientais. (BARANYI et al., 1999).

Fatores bias e exatidão iguais a 1 indicam que os valores preditos e observados são exatamente os mesmos. Em microbiologia preditiva, utiliza-se os termos “*fail-safe*” (bias menor que 1) e “*fail-dangerous*” (bias maior que 1) na avaliação do desempenho de modelos preditivos. O fator de exatidão é sempre maior ou igual a 1, sendo que quanto maior o seu valor, menos precisa é a predição. O RMSE é uma medida da variabilidade residual e, quanto menor o seu valor, maior a capacidade do modelo de descrever os dados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRESUNTO

Os resultados das médias das análises feitas em triplicata para a caracterização das peças de presunto utilizadas nos experimentos encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Médias e desvios padrão das análises realizadas no presunto.

<b>Análise</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
pH	6,20	± 0,09
Atividade de água	0,975	± 0,002
NaCl (% em massa)	2,38	± 0,24

Kalschne et al. (2014) e Menoncin et al. (2005) encontraram 0,97 como valor característico para a atividade de água do presunto, enquanto Hoffmann (2001) afirma que a atividade de água característica de produtos cárneos fica em torno de 0,98. O valor de atividade de água para o presunto encontrado no presente trabalho (0,975) era esperado, pois se encontra entre os dois valores da literatura citados.

Quanto ao pH, estudos anteriores realizados por Jay (2005) apresentam a faixa de pH entre 5,9 e 6,1 como sendo apropriada ao presunto. Já Holley (1997) afirma que, para a garantia da qualidade sensorial, o pH do presunto deve apresentar-se maior que 6,0. Franco e Landgraf (1996) citam 6,2 como sendo o pH geralmente encontrado em presuntos frescos. Dessa forma, o valor de pH encontrado para o presunto no presente estudo mostra-se apropriado, pois encontra-se dentro da faixa abordada pelos autores.

Segundo Gava (1984), a maior parte das bactérias, incluindo as bactérias ácido lácticas, são capazes de se desenvolver em alimentos com atividade de água maior que 0,90 e pH próximo da neutralidade, sendo que as bactérias produtoras de ácido desenvolvem-se, sem prejuízos, em meio levemente ácido.

A concentração de NaCl em amostras comerciais de presunto pode variar com a empresa fabricante e o lote de fabricação. Segundo Bressan et al. (2007), os produtos cárneos fatiados, de modo geral, apresentam teores de sal entre 2 a 4%. Ferreira (2004) concluiu, em seu trabalho, que há “inibição” do crescimento (representada por aumento da fase lag) da espécie *Lactobacillus viridescens* quando a concentração

de sal no meio é superior a 2,8%, acima da concentração das amostras do presente estudo.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que, de acordo com as análises realizadas, as amostras de presunto selecionadas apresentam características esperadas para este alimento e são um meio de crescimento propício para o estudo do desenvolvimento de bactérias ácido lácticas.

## 4.2 MODELOS SECUNDÁRIOS

### 4.2.1 ABORDAGEM GERAL

A abordagem geral de construção dos modelos secundários está descrita no item 3.8.2, sendo os dados utilizados para a construção dos mesmos apresentados na Tabela 2.

O modelo da raiz quadrada (Equação (10)) foi selecionado para representar a influência da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ), pois apresentou o maior valor de  $R^2$  (coeficiente de correlação), em comparação preliminar com outros modelos, apresentados no ANEXO 3. Este já era um resultado esperado, pois Camargo (2015), além de vários outros autores, também obteve nesse modelo seu melhor ajuste na descrição da dependência do  $\mu$  com a temperatura.

A Equação (20) apresenta o modelo da raiz quadrada ajustado aos dados experimentais e a Figura 8 expõe o gráfico do ajuste, com seu respectivo valor de  $R^2$ .

$$\sqrt{\mu} = 0,029(T + 1,3) \quad (20)$$

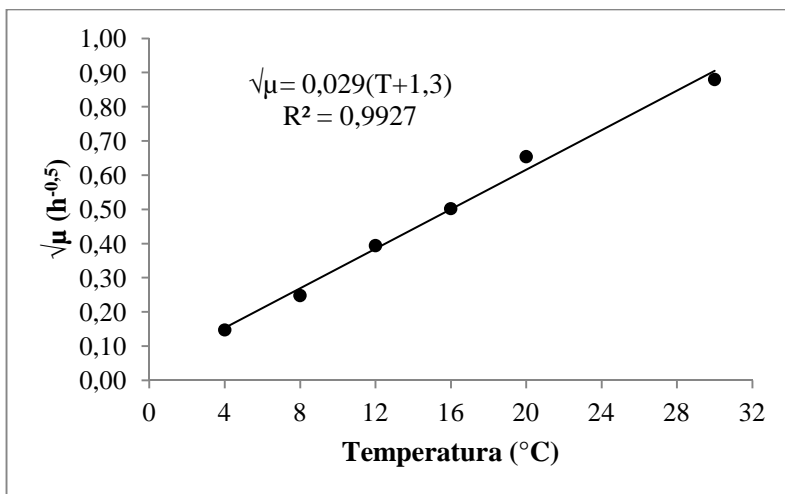


Figura 7- Modelo secundário (abordagem geral): Efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ).

De acordo com a Equação (20), os valores dos parâmetros  $b$  e  $T_{\min}$  do modelo da raiz quadrada para a abordagem geral são, respectivamente,  $0,029 \text{ h}^{-0,5}\text{°C}^{-1}$  e  $-1,3 \text{ °C}$ .

A média aritmética dos valores de  $y_{\max}$  apresentados na Tabela 2 resultou em  $21 \pm 1$ , sendo este o valor utilizado na predição para todas as condições avaliadas.

#### 4.2.1 ABORDAGEM ESPECÍFICA

A abordagem específica de construção dos modelos secundários está descrita no item 3.8.2, sendo os dados utilizados pra construção dos mesmos apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Da mesma forma que a abordagem geral, o modelo da raiz quadrada foi selecionado para representar a influência da temperatura sobre a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ ). A Tabela 4 mostra as equações resultantes do ajuste do modelo da raiz quadrada aos valores do parâmetro  $\mu$  obtidos isotermicamente, com seus respectivos valores de  $R^2$ , bem como os valores de  $y_{\max}$  calculados.



Tabela 4 - Modelos secundários resultantes da abordagem específica.

Condições	$y_{m\acute{a}x}$ [Md $\pm$ Dp]	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
NI-1	20 $\pm$ 1	$\sqrt{\mu}=0,030(T+0,71)$	0,9951
NI-2	22 $\pm$ 0	$\sqrt{\mu}=0,027(T+2,9)$	0,9891
NI-4	21 $\pm$ 1	$\sqrt{\mu}=0,030(T+0,71)$	0,9951
NI-5	20 $\pm$ 1	$\sqrt{\mu}=0,031(T+0,57)$	0,9889
NI-6	21 $\pm$ 0	0,062	NC

NC – não calculado

Os menores valores obtidos para  $y_{m\acute{a}x}$ , segundo a abordagem específica, foram para as condições NI-1 e NI-5, pois nestes experimentos temperaturas mais baixas foram mantidas por mais tempo. O parâmetro  $y_{m\acute{a}x}$  obtido isotermicamente em meio de cultura para a temperatura de 4 °C influenciou fortemente o valor deste parâmetro.

Como o perfil NI-3 utilizou todas as temperaturas do intervalo em que os experimentos isotérmicos foram avaliados, o modelo secundário da raiz quadrada, que descreve a sensibilidade do parâmetro  $\mu$  com a temperatura, da abordagem específica é o mesmo da abordagem geral. E coincidentemente o valor de  $y_{m\acute{a}x}$  encontrado para as duas abordagens foi igual, porém a forma de calculá-lo foi diferente.

Outros autores encontraram valores máximos do crescimento microbiano em torno de uma média dentro das faixas de temperatura aplicadas, para diferentes microrganismos. Koutsoumanis (2001) encontrou  $y_{m\acute{a}x} = 8,4 \pm 0,7$  [log (UFC/g)] para o crescimento de *Pseudomonas* spp. em peixe, no intervalo de temperatura de 0 a 15 °C. Fujikawa (2010), na avaliação do crescimento de *Escherichia coli* em caldo nutriente, encontrou  $8,9 \pm 0,1$  [log (UFC/g)] como sendo a população máxima atingida no intervalo de 27,6 °C até 36 °C. Nestes casos, a população máxima atingida é independente da temperatura, sendo possível perceber um baixo valor de desvio padrão.

Segundo Corradini et al (2006), é de imprescindível importância para a predição que os modelos secundários estejam bem ajustados aos dados. Os melhores ajustes obtidos no presente trabalho para o efeito da temperatura sobre o  $\mu$  são para a abordagem geral (R<sup>2</sup> = 0,9927) e a abordagem específica das condições NI-1 e NI-4 (R<sup>2</sup> = 0,9951).

#### 4.3 AJUSTE PRIMÁRIO

O crescimento de *Lactobacillus viridescens* à temperatura de 8 °C em presunto fatiado embalado a vácuo está representado na Figura 8. A linha sólida representa o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais e linha descontínua, que acompanha o modelo, representa o intervalo de confiança de 95%, ou seja, se forem realizados 100 experimentos, em 95 os resultados experimentais devem estar dentro dessa faixa.

Não foi observado crescimento de bactérias ácido lácticas nas amostras de presunto não inoculado, ao longo de todo o experimento (384 horas).

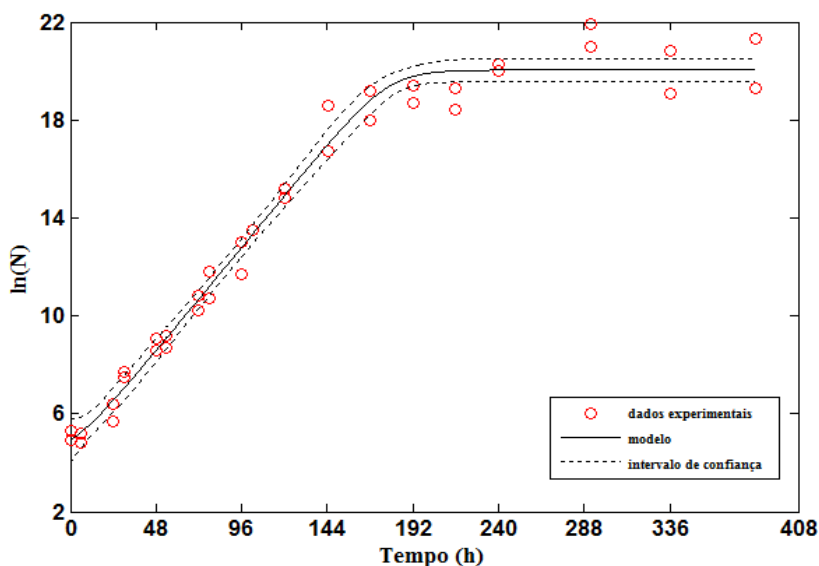


Figura 8 - Gráfico de crescimento de *Lactobacillus viridescens* a 8 °C e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto.

A Tabela 5 apresenta os valores dos parâmetros primários de crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto a 8 °C, obtidos mediante ajuste demonstrado na Figura 8.

Tabela 5 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 8 °C.

$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	$\lambda$ [h]	$y_{\text{máx}}$
0,088	6,3	20

Os índices estatísticos avaliados estão apresentados na Tabela 6, sendo possível observar o bom desempenho do modelo de Baranyi e Roberts ao ajustar-se aos dados experimentais, uma vez que os valores de R<sup>2</sup>, fator bias e fator de exatidão encontram-se próximos de 1. Além disso, ao analisar a Figura 8, pode-se observar que o crescimento apresentou todas as fases características do crescimento microbiano, com uma breve fase lag de 6,3 horas.

Tabela 6 - Valores dos índices estatísticos para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais obtidos em presunto a 8 °C.

R <sup>2</sup>	RMSE	Fator de exatidão	Fator bias
0,9830	0,7292	1,0435	1,0017

No estudo do crescimento de *Lactobacillus viridescens* a 8 °C em meio de cultivo MRS, mediante ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais, Camargo (2015) obteve os seguintes valores para os parâmetros  $\lambda$ ,  $\mu$  e  $y_{\text{máx}}$ : 0 h; 0,062 [h<sup>-1</sup>] e 20,88, respectivamente. Quando se utiliza o modelo secundário obtido com dados de meio de cultivo MRS (descrito pela Equação (20)) para estimar o valor da velocidade específica máxima de crescimento à temperatura constante de 8 °C, obtém-se  $\mu = 0,073$  [h<sup>-1</sup>], valor mais próximo daquele encontrado pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais coletados em presunto. No trabalho citado e no presente estudo, a fase estacionária foi atingida aproximadamente ao mesmo tempo (240 h), o que justifica um maior valor para velocidade máxima específica de crescimento desta bactéria no presunto (0,082 h<sup>-1</sup>), seria uma forma de “compensar” o tempo despendido na fase lag se adaptando ao novo meio de crescimento.

De acordo com a Equação (8), conhecendo o valor de  $\mu$  e  $\lambda$ , consegue-se uma estimativa do valor de  $h_0$ . Como citado anteriormente, o valor de  $h_0$  é geralmente tomado como constante quando o meio de crescimento e condições de inoculação são os mesmos, pois este representa o estado fisiológico das células no modelo

de Baranyi e Roberts. Então, espera-se que, ao se realizar experimentos de crescimento de *L. viridescens* em presunto sob diferentes condições isotérmicas e ajustar este modelo aos dados experimentais, o valor de  $h_0$  (0,55) obtido no presente experimento (8 °C) seja o mesmo para todas as temperaturas avaliadas.

De acordo com Antwi et al. (2007), a matriz do alimento, por ser mais complexa do que o meio de cultivo tradicional, pode afetar o crescimento dos microrganismos, reduzindo a velocidade inicial de multiplicação dos mesmos. O crescimento pode apresentar, por exemplo, uma extensão do tempo de adaptação (fase lag), como foi aqui observado.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PREDITIVA DO MODELO NÃO ISOTÉRMICO DE BARANYI E ROBERTS SOB DUAS ABORDAGENS DOS MODELOS SECUNDÁRIOS

Os dados de crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e a respectiva predição gerada a partir do modelo dinâmico de Baranyi e Roberts (Equações (11) e (12)), com os modelos secundários seguindo a abordagem geral e específica, estão representados nas Figuras 9, 10, 11, 12, 13, e 14, que apresentam, respectivamente, as condições NI-1, NI-2, NI-3, NI-4, NI-5 e NI-6. Para todos os perfis de temperatura avaliados, não houve observação de crescimento de BAL nas amostras não inoculadas com o microrganismo.

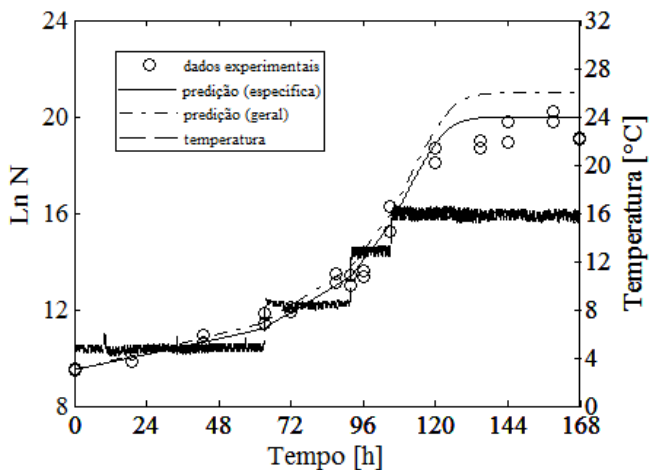


Figura 9 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-1 (4-8-12-16 °C).

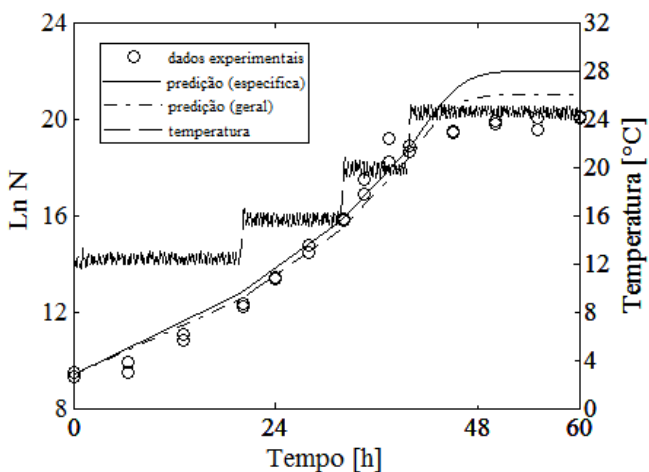


Figura 10 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-2 (12-16-20-25 °C).

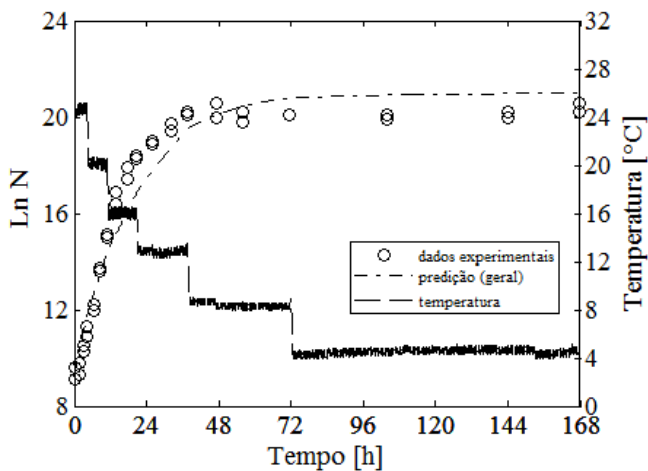


Figura 11 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-3 (25-20-16-12-8-4 °C).

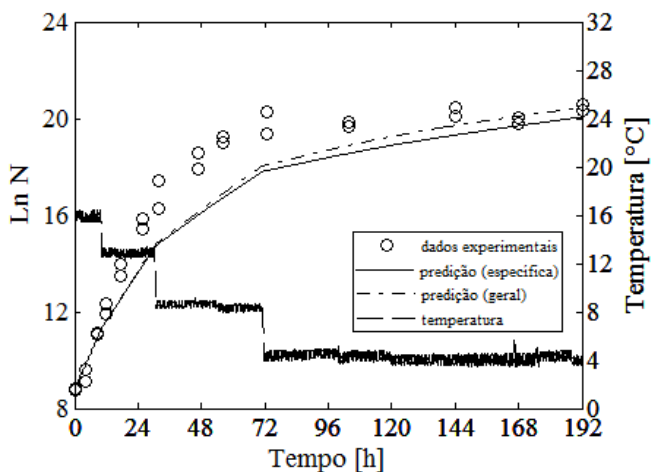


Figura 12 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-4 (16-12-8-4 °C).

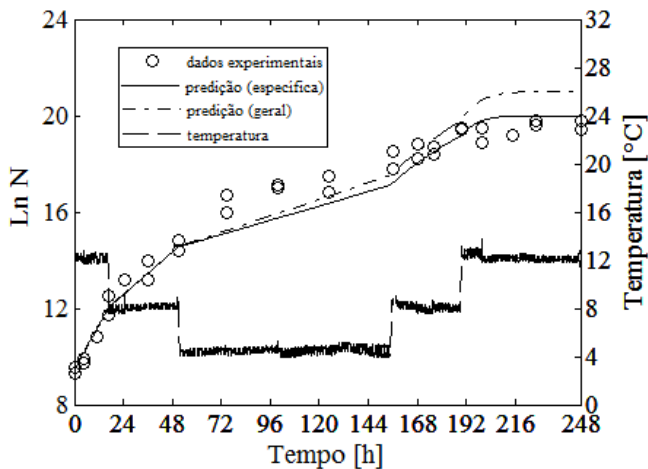


Figura 13 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-5 (12-8-4-8-12 °C).

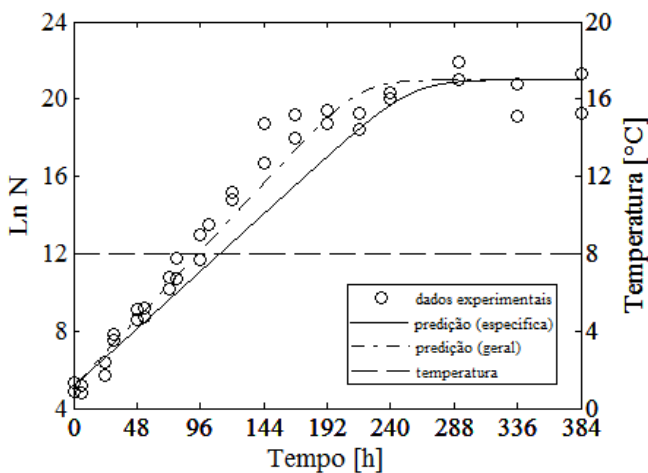


Figura 14 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e predição gerada pelo modelo de Baranyi e Roberts - Condição NI-6 (8 °C).

No ANEXO 1 encontram-se os dados de crescimento obtidos experimentalmente para todas as condições avaliadas e no ANEXO 2

estão os gráficos dos dados preditos vs. dados observados experimentalmente, como forma de complementar a análise da predição.

Com exceção do experimento NI-4 (Figura 12), houve uma superestimação da predição quanto à população máxima atingida quando a abordagem geral dos modelos secundários é adotada, pois o valor alcançado experimentalmente ficou em torno de 20 e o valor fixado para a população máxima atingida nesta abordagem é maior (21).

Na predição gerada para as condições NI-1 e NI-5, utilizando a abordagem específica dos modelos secundários, houve melhor acordo entre os dados experimentais e o modelo na fase estacionária, estando tal fato claramente visível no gráfico das Figuras 9 e 13. Isso porque a média ponderada do parâmetro  $y_{máx}$  resultou em 20.

A duração da fase lag e a velocidade máxima específica de crescimento são os parâmetros de crescimento de maior interesse (BARANYI; ROBERTS, 1994; AUGUSTIN; CARLIER, 2000; DALGAARD; KOUTSOUMANIS, 2001), pois, na maioria dos alimentos, a deterioração ocorre antes do crescimento microbiano alcançar a fase estacionária.

Para o presunto e produtos cárneos em geral, o ponto de deterioração causado pelo crescimento de BAL é definido como  $10^7$  UFC/g (SLONGO, 2008). Segundo Gogou et al. (2015), esse ponto poder ser estendido até o crescimento deste grupo de bactérias atingir a concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/g. É importante observar que ambas concentrações de BAL são obtidas ainda na fase de crescimento exponencial, considerando todos os experimentos realizados no presente trabalho.

Pode-se observar que o início da fase estacionária foi bem predita pelo modelo, em ambas as abordagens dos modelos secundários, exceto na condição NI-4 (Figura 12), na qual a fase estacionária foi alcançada nos resultados experimentais antes ao previsto pelo modelo.

Apesar do ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados de crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto sob condição isotérmica (8 °C) sugerir que há fase lag no desenvolvimento desse microrganismo nesse meio, em condições não isotérmicas apenas a condição NI-2 (Figura 10) apresenta uma visível fase lag nos dados experimentais e não prevista pelo modelo, pois este considera os dados obtidos em meio de cultivo MRS por Camargo (2015).

Segundo Swinnen (2004), súbitas variações ambientais durante o crescimento podem resultar em atraso de crescimento, denominada como “fase lag intermediária”. O mecanismo de adaptação inicial e de



adaptação intermediário pode ser considerado como sendo essencialmente o mesmo, visto que em ambos os casos há uma transição de uma condição para outra. Porém, no presente estudo este fenômeno foi observado com um certo atraso, visível principalmente no experimento NI-5 (Figura 13) quando há redução de temperatura para 4 °C, pois a velocidade de crescimento da bactéria não foi instantaneamente alterada com a redução de temperatura, como sugere a modelagem. Isto pode ser explicado pelo fato de que a temperatura interna da estufa incubadora foi utilizada para gerar a predição, sendo necessário um tempo para que haja transferência de calor entre o ambiente e as amostras inoculadas de presunto, retardando a resposta microbiana àquela mudança de temperatura.

Foram realizadas comparações entre o crescimento de *L. viridescens* em presunto e em meio de cultivo MRS sob duas condições de temperatura variável, NI-4 (16-12-8-4 °C) e NI-5 (12-8-4-8-12 °C), apresentadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente. A temperatura apresentada nas Figuras 15 e 16 é a temperatura teórica, uma vez que os experimentos foram realizados em ocasiões diferentes, não apresentando exatamente a mesma temperatura real de incubação. As predições apresentadas consideram a condição real de temperatura, obtida por meio de *datalogger*, de cada experimento e foram realizadas utilizando a abordagem geral de construção dos modelos secundários. Para padronização dos dados, os gráficos se apresentam em  $\ln(N/N_0)$  em função de  $t$ , pois dessa forma, não há influência da concentração inicial do microrganismo, uma vez que este valor foi diferente para os experimentos em presunto e em MRS. Os dados de crescimento em MRS foram retirados do trabalho de Martins (2015).

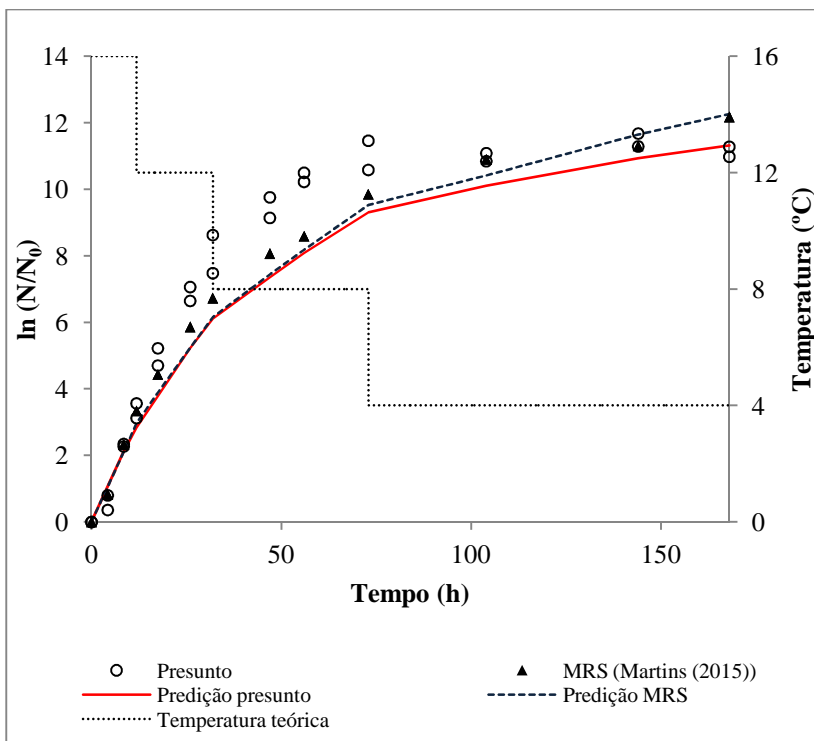


Figura 15 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e meio de cultivo MRS e predições geradas pelo modelo de Bananyi e Roberts, utilizando a abordagem geral de construção dos modelos secundários para NI-4 (16-12-8-4 °C).

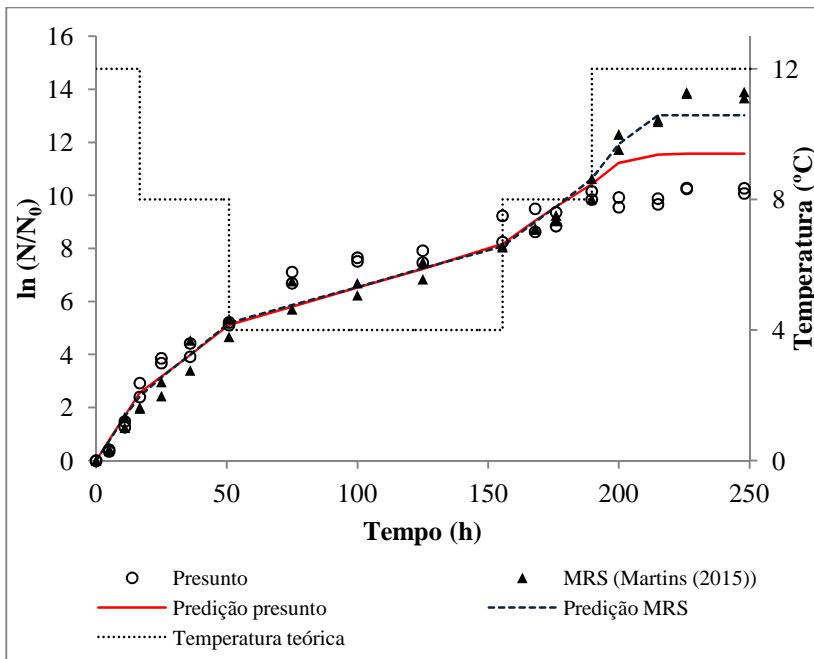


Figura 16 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto e meio de cultivo MRS e predições geradas pelo modelo de Bananyi e Roberts, utilizando a abordagem geral de construção dos modelos secundários para NI-5 (12-8-4-8-12 °C)

Ao analisar as Figuras 15 e 16, pode-se observar que o presunto (meio sólido) possui maior resistência à transferência de calor do que o MRS (meio líquido), pois o microrganismo demora mais tempo para responder à diminuição da temperatura, como foi comentado anteriormente. É possível observar, também, que, apesar dos dados de crescimento em meio de cultivo apresentarem maior acordo com a predição, eles não diferem substancialmente dos dados de crescimento em presunto, o que suporta ainda mais a utilização de modelos desenvolvidos em meio de cultivo para a predição do crescimento microbiano em alimentos.

Os índices estatísticos utilizados na avaliação da capacidade de predição do modelo e na comparação entre as abordagens utilizadas para a construção dos modelos secundários estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Índices estatísticos utilizados na avaliação da predição e do desempenho de cada abordagem do modelo secundário.

<b>Condições</b>	<b>Fator Bias</b>	<b>Fator de Exatidão</b>	<b>RMSE</b>
<b>Secundário geral</b>			
NI-1	1,0326	1,0393	0,9191
NI-2	1,0134	1,0382	0,7641
NI-3	0,9930	1,0508	0,8984
NI-4	0,9450	1,0682	1,3317
NI-5	1,0038	1,0413	0,8362
NI-6	0,9944	1,0594	0,9907
<b>Secundário específico</b>			
NI-1	1,0050	1,0247	0,5030
NI-2	1,0386	1,0499	1,1444
NI-4	0,9376	1,0751	1,4449
NI-5	0,9877	1,0359	0,6750
NI-6	0,9367	1,1010	1,6291

No presente estudo, os valores encontrados para o RMSE são mais elevados do que os encontrados por outros autores do grupo de Pesquisa em Microbiologia Preditiva do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC (DALCANTON, 2010; CAMARGO, 2015), provavelmente pelo fato de utilizar um meio complexo (presunto) para a predição não isotérmica do crescimento de *Lactobacillus viridescens*, enquanto os parâmetros de crescimento que deram origem aos modelos secundários foram obtidos em meio de cultivo MRS.

Grande parte do valor do RMSE se deve à fase estacionária do crescimento microbiano, pois foi onde se observaram os maiores desvios dos valores preditos em relação aos observados. Os menores valores de RMSE (0,5030 e 0,6750) foram observados nas condições NI-1 e NI-5 (abordagem específica), onde  $y_{\max}$  é fixado em 20, não havendo superestimação do modelo quanto à essa fase. Nos experimentos NI-3 e NI-2 (abordagem geral) também foram obtidos valores razoáveis para o índice RMSE – 0,8984 e 0,7641, respectivamente - pela mesma razão.

Quando o fator bias é maior que 1, significa que a predição do modelo foi, de forma geral, maior do que os dados coletados em laboratório. Tal comportamento é chamado de “*fail safe*”, o que quer

dizer que o modelo falhou de forma segura, ou seja, superestimou o crescimento microbiano. Já quando o valor do fator bias é menor que 1, dizemos que o modelo falhou de forma perigosa (“*fail dangerous*”), pois subestimou o crescimento microbiano.

Ao utilizar um modelo que superestima os dados de crescimento microbiano na aferição da vida útil de determinado alimento, indústrias de alimentos e consumidores estão ganhando em termos de segurança (*foodsafety*), pois haverá garantia de que o alimento não estará deteriorado antes do prazo estabelecido. Porém, tal superestimação não pode ser acentuada, pois acarretaria prejuízos à indústria.

No experimento NI-6, valores menores que 1 para o fator bias já eram esperados, uma vez que o valor do parâmetro  $\mu$ , para ambas as abordagens de construção dos modelos secundários, foi menor do que o valor obtido pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais, o que justifica a subestimação do crescimento pela modelagem.

Analisando a Tabela 7, pode-se afirmar que a abordagem geral dos modelos secundários foi mais precisa do que a abordagem específica do ponto de vista preditivo, pois apresentou melhores valores para os índices estatísticos nas condições NI-2, NI-4 e NI-6, de forma geral. Apenas as condições NI-1 e NI-5 apresentaram índices estatísticos mais satisfatórios para a abordagem específica, porém para esta última condição o valor do fator bias foi menor do que 1, ou seja, o modelo falhou de forma perigosa, descaracterizando a vantagem da abordagem específica para esse caso.

Uma razão para o melhor desempenho da abordagem geral na predição não isotérmica pode ser a qualidade do ajuste dos modelos secundários, uma vez que nesta abordagem o ajuste do modelo da raiz quadrada aos valores de  $\mu$  resultou em um valor de  $R^2$  maior que 0,990.

É possível notar uma tendência entre as condições não isotérmicas avaliadas:

- Quando a temperatura do experimento é crescente (NI-1 e NI-2), o fator bias é maior que 1, ou seja, a predição é segura, e o modelo consegue prever de forma mais precisa o crescimento observado até a fase exponencial, havendo uma superestimação do modelo quanto à fase estacionária;
- Quando a temperatura do experimento é decrescente (NI-3, NI-4 e NI-5 (de 0 até 156 h)), o modelo subestima o crescimento (bias menor que 1) durante a fase exponencial, o que caracteriza uma

predição perigosa, e não há significativa superestimação da fase estacionária.

Segundo Longhi (2012), as predições tendem a ser melhores quando a temperatura inicial do experimento está próxima da temperatura ótima de crescimento. Para o *Lactobacillus viridescens*, a temperatura ótima de crescimento é 30 °C e a melhor predição, segundo este autor, seria para o NI-3, o que não foi observado. Tal comportamento sugere que este microrganismo apresenta bom desenvolvimento em temperaturas de refrigeração, caracterizando-o como potencial deteriorante de produtos cárneos refrigerados, assim como reportado por Borch et al. (1996).

No presente estudo, como o fator bias não se distancia consideravelmente do seu valor ideal, o fator de exatidão se distingue de 1 apenas na sua segunda casa decimal e as curvas de crescimento experimentais estão seguindo a mesma tendência da predição, pode-se dizer que o modelo de Baranyi e Roberts, juntamente com a abordagem geral dos modelos secundários, consegue prever o crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto sob condições não isotérmicas dentro do intervalo de temperaturas estudado (4 – 25 °C), podendo este modelo ser utilizado para determinar a vida útil de produtos cárneos embalados a vácuo.

Adotando a abordagem geral de construção dos modelos secundários, a vida útil do presunto embalado a vácuo submetido às condições de temperatura estudadas foi calculada, com base no valor máximo de concentração de BAL adotado por Slongo (2008) ( $10^7$  [UFC/g] ou 16,12 [ln UFC/g]) e apresenta-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Vida útil observada e predita para as condições de temperatura avaliadas.

Condição	Vida útil observada (h)	Vida útil predita (h)	Erro (%)*
NI-1	107,5	106,1	- 1,3
NI-2	32,7	33,9	+ 3,7
NI-3	13,1	17,9	+ 36,6
NI-4	28,8	48,1	+ 67,0
NI-5	73,6	110,7	+ 50,4
NI-6	131,3	152,8	+ 16,4

\*Erro(%) = ((vida útil predita – vida útil observada)/vida útil observada) x 100

Ao analisar a Tabela 8, pode-se perceber que, os maiores tempos de vida útil foram observados nas condições onde menores temperaturas foram mantidas por tempos mais prolongados (NI-6, NI-1 e NI-5). Além disso, apenas para a condição NI-1, a vida útil predita foi menor do que a observada, o que é desejado. Nas demais condições, a vida útil observada foi alcançada primeiramente pelos dados experimentais. É importante observar que, para as condições não isotérmicas onde os maiores erros foram encontrados (NI-3, NI-4 e NI-5), o final da vida útil foi alcançado durante o tempo de abaixamento de temperatura e, como o presunto necessita de um maior tempo de adaptação àquela nova temperatura, fato que não é predito pelo modelo, houve uma subestimação do crescimento pela modelagem.

## CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o crescimento da bactéria ácido láctica *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto comercial fatiado embalado a vácuo e avaliar a capacidade preditiva de um modelo matemático ao descrever este crescimento utilizando parâmetros obtidos em meio de cultura MRS sob condições isotérmicas. Foi possível tirar as seguintes conclusões:

- O presunto utilizado caracterizou-se como meio de crescimento adequado para o de *Lactobacillus viridescens*, apresentando valores de pH, atividade de água e concentração de cloreto de sódio dentro da faixa ótima de desenvolvimento de bactérias ácido lácticas;
- Os modelos secundários propostos seguiram duas abordagens: geral (considerando todas as temperaturas dos experimentos isotérmicos em MRS) e específica (considerando apenas as temperaturas de cada experimento não isotérmico). Nos experimentos isotérmicos, que deram origem aos modelos secundários, não foi observada fase lag, sendo  $\lambda$  considerado zero. O modelo da raiz quadrada foi escolhido para representar a sensibilidade do parâmetro  $\mu$  com a temperatura, obtendo bons ajustes para ambas as abordagens. O parâmetro  $y_{máx}$  não apresentou significativa variação com a temperatura, sendo seu valor considerado constante em torno de uma média.
- O modelo de Baranyi e Roberts apresentou bons resultados preditivos em condições não isotérmicas na faixa de 4 °C a 25 °C, principalmente em condições de temperatura crescente, onde a predição foi segura. Além disso, a capacidade preditiva do modelo de Baranyi e Roberts foi melhor quando a abordagem geral dos modelos secundários foi adotada.
- Quando houve abaixamento da temperatura da incubadora, durante uma condição não isotérmica, foi observado um atraso na resposta microbiana, fato não descrito pelo modelo, sugerindo ser necessário um tempo para que haja transferência de calor entre o ambiente interno da incubadora e as amostras inoculadas de presunto.
- O modelo preditivo obtido em meio de cultivo MRS pode ser utilizado para prever o crescimento de *Lactobacillus viridescens* em presunto fatiado embalado a vácuo, com a finalidade de



determinar a vida útil deste produto submetido a diferentes condições de temperatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIÑO, M. et al. Development of a low-sodium ready-to-eat desalted cod. **Journal of Food Engineering**, v.107, p. 304-310, 2001.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v.17, p. 454-461, 2006.

ANTOLINOS, V.; MUÑOZ-CUEVAS, M.; ROS-CHUMILLAS, M.; PERIAGO, P. M.; FERNÁNDEZ, P. S.; LE MARC, Y. Modelling the effects of temperature and osmotic shifts on the growth kinetics of *Bacillus weihenstephanensis* in broth and food products. **International Journal of Food Microbiology**, v.158, p.36-41, 2012.

ANTWI, M.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J.F.; GEERAERD, A.H. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.71-84, 2007.

AUGUSTIN, J. C.; CARLIER, V. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interaction between environmental factors. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p.53-70, 2000.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 277-294, 1994.

BARANYI, J. Commentary: Simple is good as long as it is enough. **Food Microbiology**, v.14, p.189-192,1997.

BARANYI, J.; PIN, C; ROSS,T. Validating and comparing predictive models. **International Journal of Food Microbiology**, v.48, p.159-166, 1999.

BERNAERTS, K. et al. Modeling Microbial Dynamics under Time-Varying Conditions. In: (Ed.). **Modelling microbial responses in food**. Washington D.C., CRC Press, p.255-273, 2004.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.103-120, 1996.

BRESSAN, M.C. et al. Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.433-438, 2007.

BUCHANAN, R. L. Predictive food microbiology: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.4 p. 6-11, 1993.

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**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

CAO-HOANG, L.; CHAINE, A.; GRÉGOIRE, L.; WACHÉ, Y. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. **Food Microbiology**, v. 27, n.7, p.940-944, 2010.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CONCHA-MEYER, A.; SCHÖBITZ, R.; BRITO, C.; FUENTES, R. Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. **Food Control**, v.22, p. 485-489, 2011.

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

CORRADINI, M. G. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.223-226, 2006.

CULLEN, A.C.; FREY, H.C. **Probabilistic Techniques in Exposure Assessment: A Handbook for Dealing with Variability and Uncertainty in Models and Inputs**. Plenum Press, New York, EUA, 1999.

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

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, p.183-196, 2001.

ENNAHAR, S.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.6, p. 705-716, 1999.

FERREIRA, C. L. L. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

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

FRANCO, B. G. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, SP, Brasil, 1996.

FRANZ, C.M.A.P.; von Holy, A. Bacterial populations associated with pasteurized vacuum-packed Vienna sausages. **Food Microbiology**, v.13, p.165-174, 1996.

FU, B.; TAOUKIS, P.; LABUZA, T. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy-products with time-temperature integrators. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1209-1215, 1991.

FUJIKAWA, H. Development of a New Logistic Model for Microbial Growth in Foods. **Biocontrol Science**, v. 15, n. 3, p. 75-80, 2010.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. Ed. Nobel, 1ª ed., São Paulo, 1984.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 479-490, 1987.

GILL, C.O. **Meat Microbiology: Microbial interactions in meats**. Applied Science Publishers Ltda. London, 1982.

GOGOU, E.; KATSAROS, G.; DERENS, E.; ALVAREZ, G.; TAOUKIS, P.S. Cold Chain Database development and application as a tool for the cold chain management and food quality evaluation, **International Journal of Refrigeration**, doi: 10.1016/j.ijrefrig.2015.01.019, 2015.

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

GOLDBLITH, S.A., JOSLYN, M.A., NICKERSON, J.T.R., Introduction to Thermal Processing of Foods: An anthology of Food Science, v.1, **AVI Publishing Company**, 1961.

GWANPUA, S.G. et al. The FRISBEE tool, a software for optimizing the trade-off between food quality, energy use, and global warming impact of cold chain. **Journal of Food Engineering**, v.148, p.2-12, 2015.

HOANG, H. M.; FLICK, D.; DERENS, E.; LAGUERRE, O. Combined deterministic and stochastic approaches for modeling the evolution of

food products along the cold chain. Part II: A case study. **International Journal of Refrigeration**, v.35, p.915-926, 2012.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, v.9, p.23-30, 2001.

HOLLEY, R. A. Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of bacteria in vacuum packaged cured ham. **Food Microbiology**, v. 14, p. 201-211, 1997.

HUANG, L. A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.100-107,2014.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p. S139-S150, 1998.

ISEPPI, R. et al. Anti-listerial activity of coatings entrapping living bacteria. **Soft Matter**, v.7, n.18, p.8542-8548, 2011.

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

KALSCHNE, D.; GEITENES, S.; VEIT, M. R.; SARMENTO, C. M. P; COLLA, E. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: a model approach. **Meat Science**, v.98, p.744-752, 2014.

KAPETANAKOU, A.E.; AMPAVI, A.;YANNIOTIS, S.; ELEFThERIOS H. DROSINOS, E.H.; SKANDAMIS, P.N. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius in vitro* and evaluation in food matrices of different viscosity. **Food Microbiology**, v.28, p.727-735, 2011.

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

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films

containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v.22, n.3, p.373-386, 2008.

LABUZA, T. P; FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p. 309-323, 1993.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 2006.

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

MANIOS, S.G.; LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N. A generic model for spoilage of acidic emulsified foods: Combining physicochemical data, diversity and levels of specific spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.170 p.1–11, 2014.

MARTINS, W. F. **Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2015.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. Ed. Varela, São Paulo, SP, 2005.

MENONCIN, S. et al. Avaliação da flora microbiana no presunto cozido com fibra de trigo. **Higiene Alimentar**, v.19, p.77-80, 2005.

MILBOURNE, K. Thermal Tolerance of *Lactobacillus viridescens* in Ham. . **Meat Science**, v.9, p.113-119, 1983.

McCLURE, P.J., BLACKBURN, C de W., COLE, M.B., CURTIS, P.S., JONES, J.E., LEGAN, J.D., OGDEN, I.D., PECK, M.W., ROBERTS, T.A., SUTHERLAND, J.P., WALKER, S.J. Review Paper. Modelling

the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, 1994.

McDONALD, K. e SUN, D. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p. 1-27, 1999.

McKELLAR, R. C.; LU, X. **Modeling Microbial Response in Food**. CRC series in contemporary food science. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2004.

McMEEKIN, T. A.; OLLEY, M. B.; ROSS, T., RATKOWSKY, D. A. Predictive Microbiology: theory and application. **Researches Studies**, p. 1-86, 1993.

McMEEKIN, T. et al. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology** v. 128, n. 1, p. 2-9, 2008.

MORISHITA, Y.; SHIROMIZU, K. Characterization of lactobacilli isolated from meat and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.3, p. 19-29, 1986.

NEETOO, H.; YE, M.; CHEN, H.; JOERGER, R. D.; HICKS, D. T.; HOOVER, D. G. Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, n.1, p.8-15, 2008.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, p. 77-89, 2008.

PAL, A.; LABUZA, T.; DIEZ-GONZALEZ, F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 460-470, 2008.



PATTERSON, M. F.; McKAY, A.M.; CONNOLLY, M.; LINTON, M. Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. **Food Microbiology**, v.27, p.266-273, 2010.

RATKOWSKY, D. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1-5, 1982.

ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Predictive Microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.41-264, 1999.

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

ROSS, T. **Predictive food microbiology models in the meat industry**. Meat and Livestock Australia, Sydney, Austrália, 1999.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; IVAN, J.; SAAVEDRA, Q.; CHIRALT, A. Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. **Food Hydrocolloids**, v.33, n.1, p.92-98, 2013.

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

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

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

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

SLONGO, A. et al. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 303-306, 2009.

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

SWINNEN, I.A.M., BERNAERTS, E.J.J., DENS, A.H., GEERAED, J.F., VAN IMPE, J.F. Predictive modeling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.137-159,2004.

TIJSKENS, L. M. M.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; NICOLAÏ, B. M. **Food Process Modelling**. Woodhead Publishing Limited, Cambring, England, 2001.

VALÍK, L.; BARANYI, J.; GÖRNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roquefort*. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.141-146, 1999.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 97-105, 2005.

VAN IMPE, J. F. et al. Dynamic Mathematical Model To Predict Microbial Growth and Inactivation during Food Processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2901-2909, 1992.

VAN IMPE, J. F.; VERCAMMEN, D.; VAN DERLINDEN, E. Developing next generation predictive models: a systems biology approach. In: TAOUKIS, et al. **11th International Congress on Engineering and Food**, Atenas, Grécia. p. 465-466, 2011.

VERMEIREN, L., DEVLIEGHERE, F., DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactc acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.149-164, 2004.

WHITING, R.; BUCHANAN, R. A classification of models in predictive microbiology - reply. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.

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

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. Glasgow: Chapman & Hall, 1995.

WHO; FAO. **Exposure assessment of microbiological hazard in food: Guidelines**. 2008.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of bacterial-growth with shifts in temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 204-213, 1994.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.

ANEXO 1 – DADOS EXPERIMENTAIS DE CRESCIMENTO DE *LACTOBACILLUS VIRIDESCENS*

A seguir são apresentadas as tabelas com o crescimento de *Lactobacillus viridescens* observada em cada experimento (contagem das placas multiplicada pelo inverso da diluição), onde A1 e A2 são os códigos das duplicatas.

Tabela 9 – Crescimento de *Lactobacillus viridescens* ao longo do tempo para o experimento isotérmico a 8 °C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>A1 (UFC/g)</b>	<b>A2 (UFC/g)</b>
0	1,3E+02	2,0E+02
6	1,2E+02	1,8E+02
24	2,9E+02	5,9E+02
30	1,9E+03	2,3E+03
48	5,5E+03	9,0E+03
54	6,1E+03	1,0E+04
72	2,7E+04	5,1E+04
78	4,6E+04	1,4E+05
96	1,2E+05	4,6E+05
102	7,1E+05	7,0E+05
120	2,8E+06	4,1E+06
145	1,8E+07	1,3E+08
168	2,2E+08	6,8E+07
192	1,4E+08	2,7E+08
216	9,5E+07	2,4E+08
240	6,5E+08	4,8E+08
292	1,3E+09	3,3E+09
336	1,1E+09	2,0E+08
384	2,5E+08	1,8E+09

Tabela 10 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 1 [NI-1] (4-8-12-16 °C).

<b>Tempo (h)</b>	<b>A1 (UFC/g)</b>	<b>A2 (UFC/g)</b>
0	1,3E+04	1,4E+04
19	1,9E+04	2,6E+04
43	5,7E+04	4,2E+04
63	9,1E+04	1,4E+05
72	1,8E+05	1,5E+05
87	7,0E+05	5,1E+05
92	6,9E+05	4,4E+05
96	6,3E+05	8,3E+05
105	4,1E+06	1,2E+07
120	7,3E+07	1,3E+08
135	1,8E+08	1,3E+08
144	1,7E+08	4,0E+08
159	4,0E+08	5,9E+08
168	2,0E+08	1,9E+08

Tabela 11 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 2 [NI-2] (12-16-20-25 °C).

<b>Tempo (h)</b>	<b>A1 (UFC/g)</b>	<b>A2 (UFC/g)</b>
0	1,1E+04	1,3E+04
6	1,3E+04	2,1E+04
13	5,1E+04	6,6E+04
20	2,0E+05	2,3E+05
24	6,8E+05	6,5E+05
28	2,6E+06	1,9E+06
32	7,2E+06	7,5E+06
34	2,1E+07	3,9E+07
38	2,2E+08	8,4E+07
40	1,6E+08	1,2E+08
45	2,9E+08	2,8E+08
50	4,4E+08	4,0E+08
55	5,1E+08	3,1E+08
60	5,1E+08	5,5E+08

Tabela 12 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 3 [NI-3] (25-20-16-12-8-4 °C).

<b>Tempo (h)</b>	<b>A1 (UFC/g)</b>	<b>A2 (UFC/g)</b>
0	8,9E+03	1,5E+04
2	1,1E+04	1,8E+04
3	3,6E+04	2,9E+04
4	5,3E+04	8,6E+04
6	1,9E+05	1,5E+05
9	7,8E+05	9,3E+05
11	3,2E+06	3,6E+06
14	1,4E+07	2,1E+07
17	3,8E+07	6,1E+07
21	1,0E+08	9,2E+07
26	1,7E+08	1,6E+08
32	2,7E+08	3,6E+08
37	5,5E+08	5,7E+08
47	8,9E+08	5,1E+08
56	6,1E+08	4,0E+08
72	5,6E+08	5,2E+08
104	4,8E+08	5,5E+08
144	4,6E+08	5,9E+08
168	6,1E+08	8,6E+08

Tabela 13 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 4 [NI-4] (16-12-8-4 °C).

<b>Tempo</b>	<b>A1 (UFC/g)</b>	<b>A2 (UFC/g)</b>
0	6,6E+03	6,4E+03
4	1,5E+04	9,2E+03
8	6,4E+04	6,7E+04
12	2,3E+05	1,5E+05
17	7,3E+05	1,2E+06
26	5,1E+06	7,5E+06
32	3,7E+07	1,1E+07
47	1,2E+08	6,0E+07
56	1,8E+08	2,3E+08
73	6,3E+08	2,5E+08
104	3,4E+08	4,2E+08
144	5,3E+08	7,6E+08
168	3,9E+08	5,1E+08
192	8,4E+08	6,9E+08



Tabela 14 - Crescimento de *Lactobacillus viridescens* ao longo do tempo para o experimento não isotérmico 5 [NI-5] (12-8-4-8-12 °C).

<b>Tempo (h)</b>	<b>A1 (UFC/g)</b>	<b>A2(UFC/g)</b>
0	1,4E+04	1,1E+04
5	2,0E+04	1,7E+04
11	5,0E+04	4,8E+04
17	2,6E+05	1,2E+05
25	5,6E+05	5,2E+05
36	1,2E+06	5,5E+05
51	2,6E+06	1,8E+06
75	1,7E+07	8,8E+06
100	2,6E+07	2,3E+07
125	3,9E+07	1,9E+07
156	5,4E+07	1,1E+08
168	7,9E+07	1,5E+08
176	9,8E+07	1,3E+08
190	2,7E+08	2,8E+08
200	2,9E+08	1,6E+08
215	2,2E+08	2,1E+08
226	4,0E+08	3,2E+08
248	4,1E+08	2,6E+08

## ANEXO 2 – GRÁFICOS: VALORES PREDITOS VS. OBSERVADOS

A seguir são apresentados os gráficos de valores preditos vs. valores observados para cada condição avaliada, seguindo as duas abordagens dos modelos secundários para a predição. A linha sólida representa a condição ideal (onde o observado é igual ao predito).

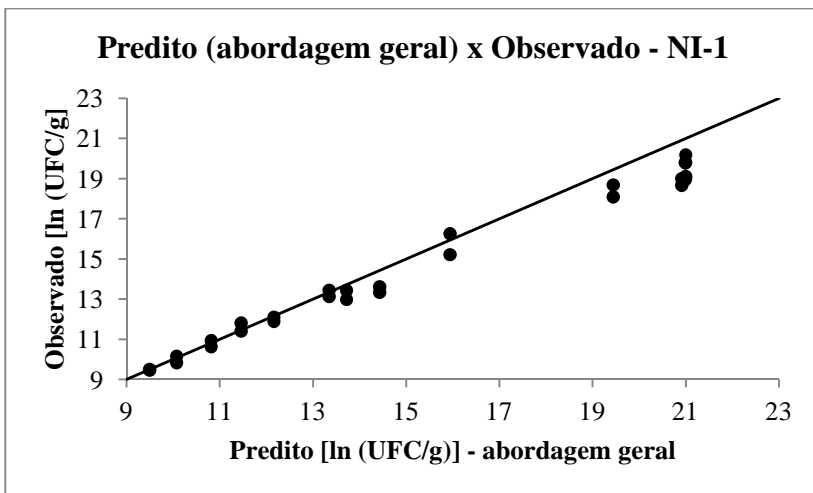


Figura 17 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-1.

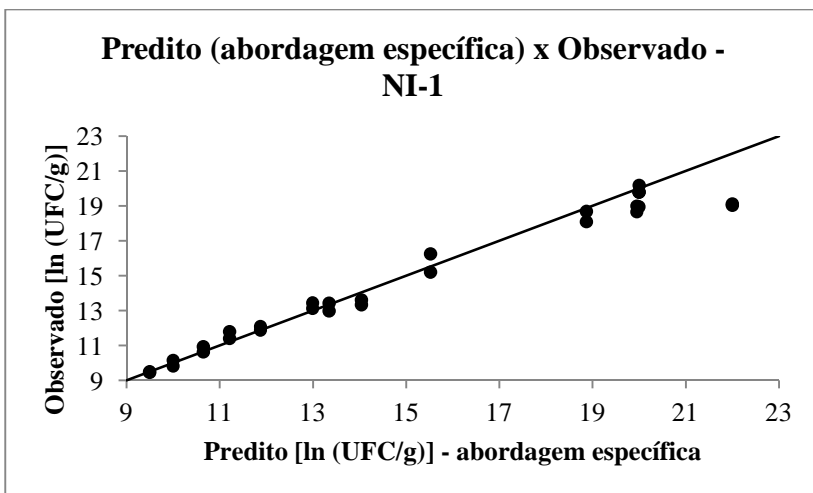


Figura 18 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-1.

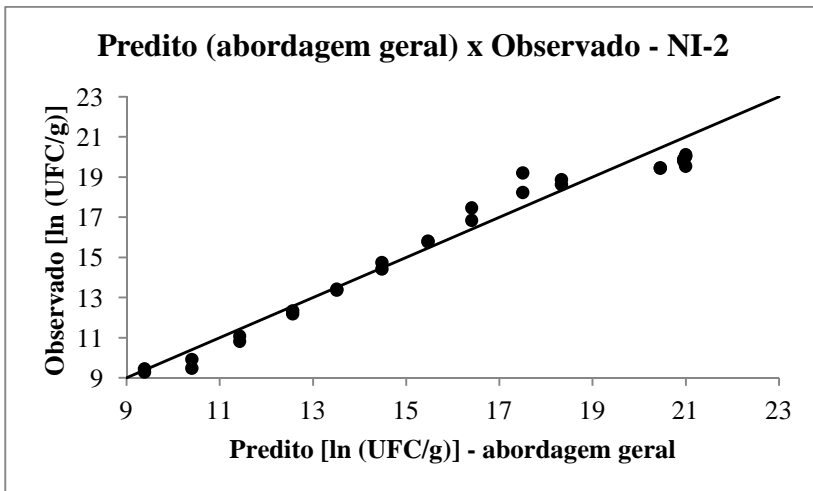


Figura 19 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-2.

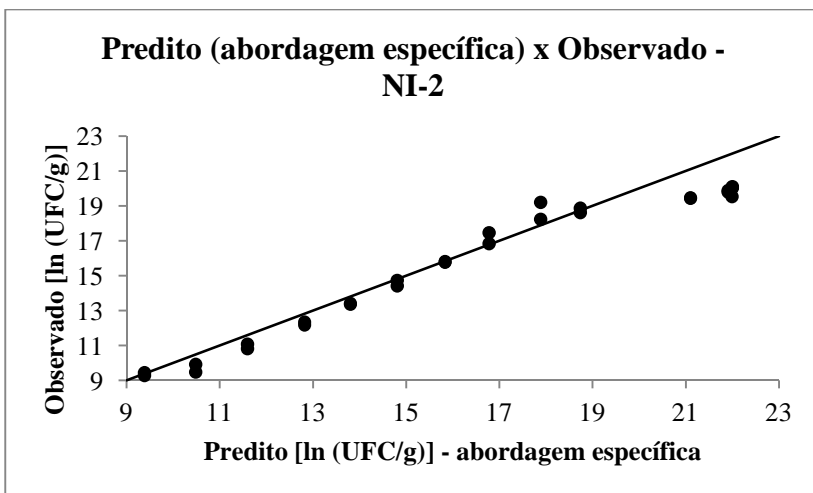


Figura 20 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-2.

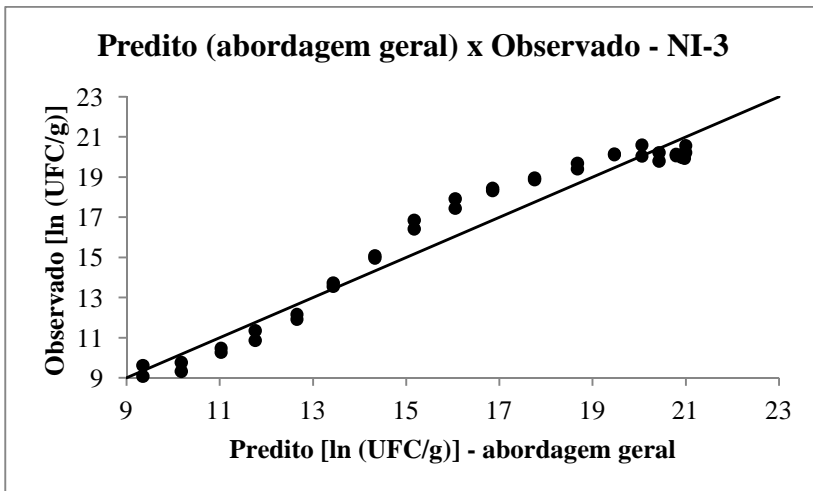


Figura 21 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-3.

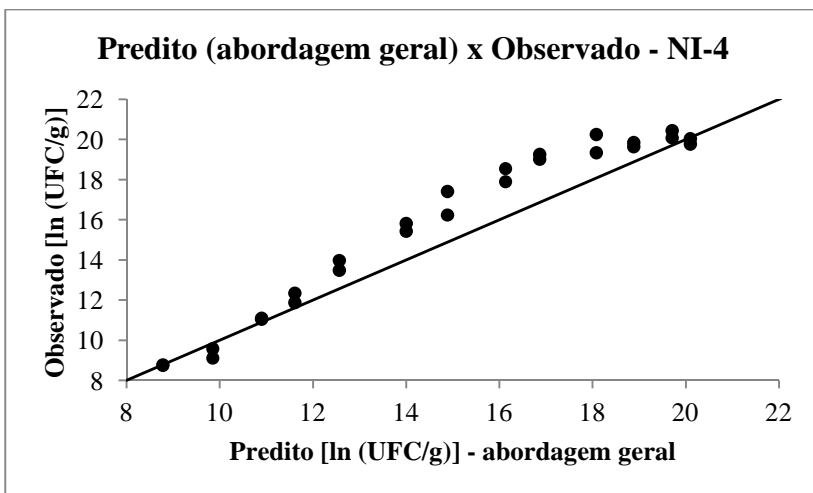


Figura 22 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-4.

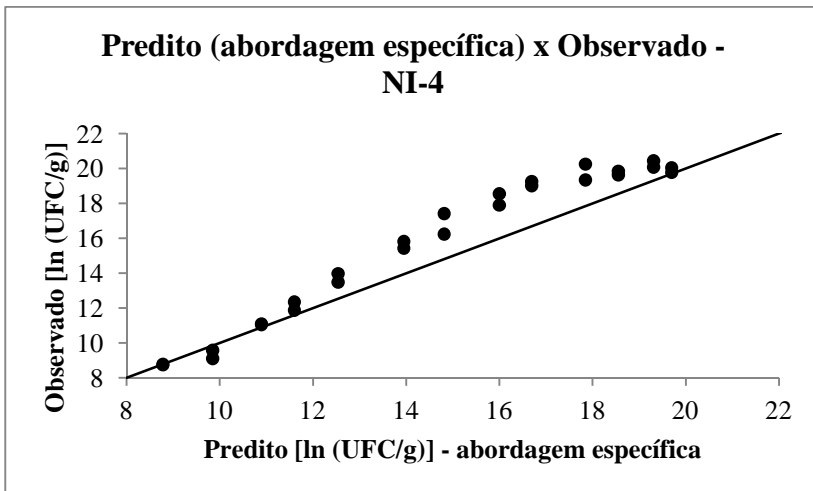


Figura 23 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-4.

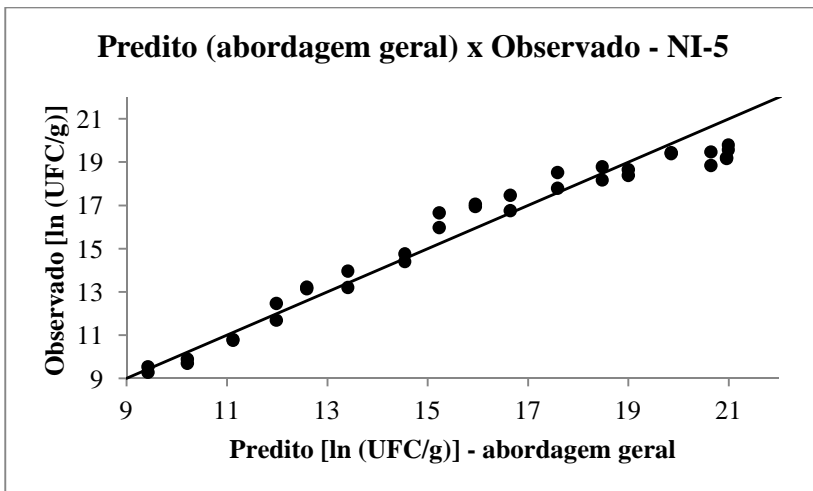


Figura 24 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-5.

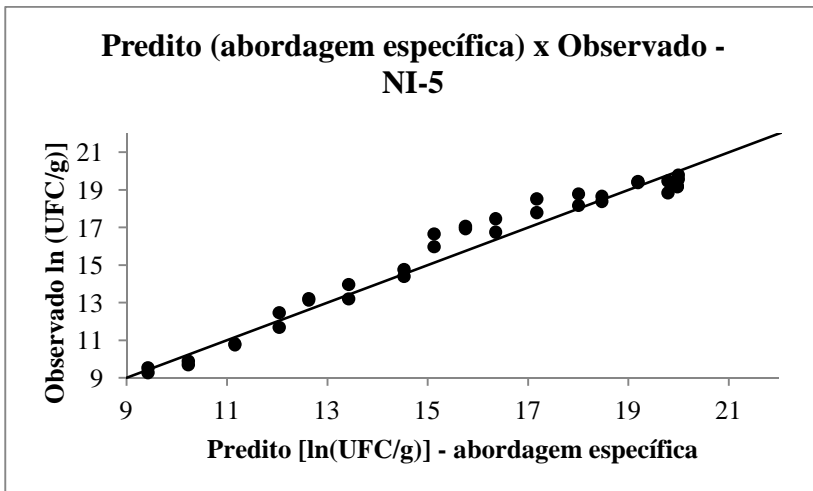


Figura 25 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-5.

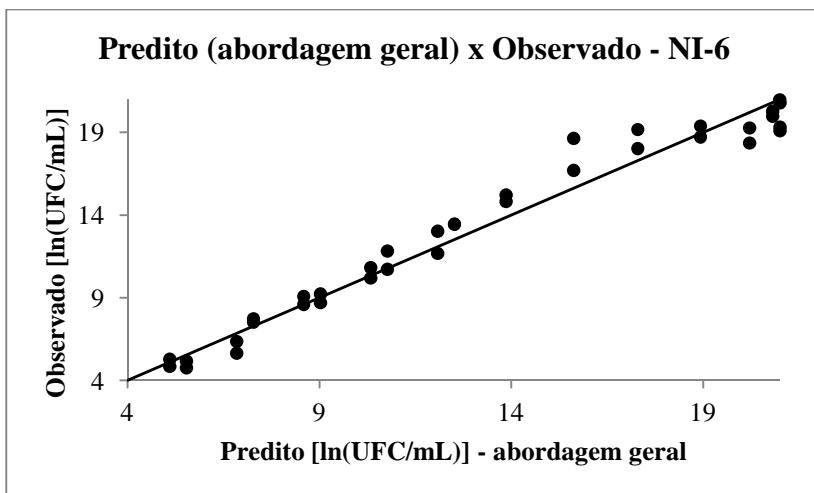


Figura 26 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem geral dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-6.

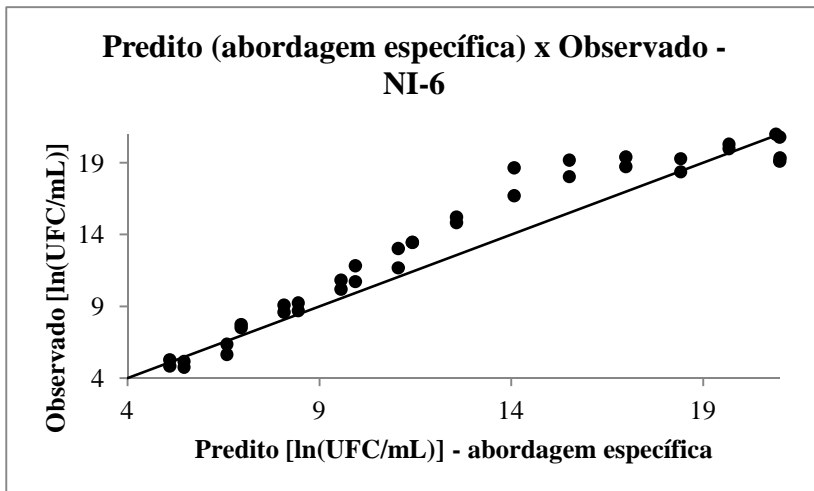


Figura 27 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de Baranyi e Roberts (segundo a abordagem específica dos modelos secundários) e os observados experimentalmente para a condição NI-6.

## ANEXO 3 – MODELOS SECUNDÁRIOS AVALIADOS

A seguir são apresentados os gráficos dos modelos secundários avaliados previamente para a descrição da dependência do parâmetro  $\mu$  com a temperatura. A linha sólida representa o ajuste do respectivo modelo aos dados e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) está apresentado juntamente com a equação resultante do ajuste.

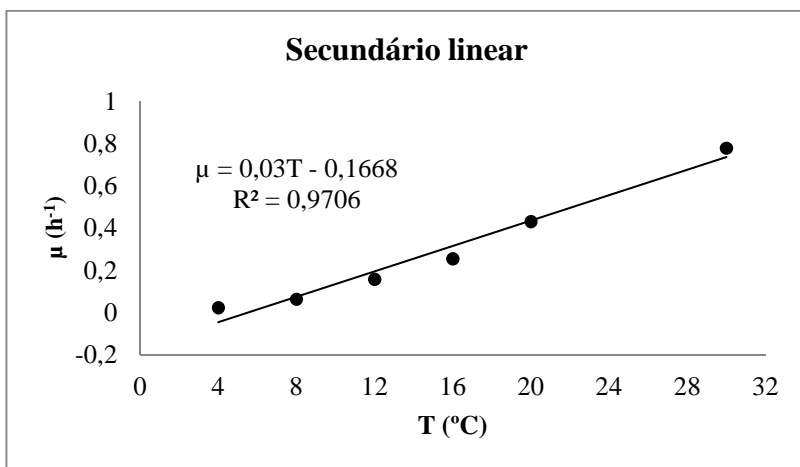


Figura 28 - Modelo secundário (linear): efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ).



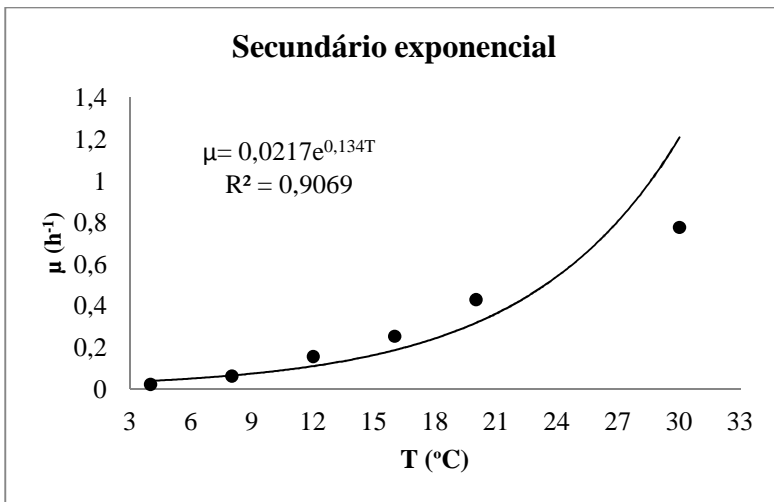


Figura 29 - Modelo secundário (exponencial): efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ).

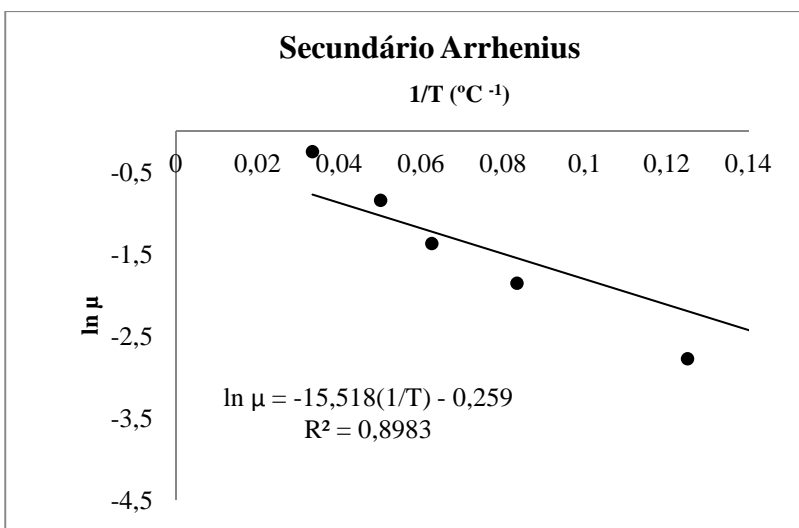


Figura 30 - Modelo secundário (tipo Arrhenius): efeito da temperatura sobre a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu$ ).