



**LETÍCIA DIAS DOS ANJOS**

**MODELOS DE CRESCIMENTO DE  
PSICROTRÓFICOS EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS E pH**

**LAVRAS-MG**

**2013**

**LETÍCIA DIAS DOS ANJOS**

**MODELOS DE CRESCIMENTO DE PSICROTRÓFICOS EM  
DIFERENTES TEMPERATURAS E pH**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos,  
para a obtenção do título de Mestre

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientador

Dr. Alexandre de Paula Peres

**LAVRAS-MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Anjos, Letícia Dias dos.

Modelos de crescimento de psicrotróficos em diferentes  
temperaturas e pH / Letícia Dias dos Anjos. – Lavras : UFLA, 2013.  
126 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Microbiologia preditiva. 2. Conservação. 3. Frio. 4. Modelos  
preditivos. 5. Modelos matemáticos. 6. Carne. 7. Bactérias. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.907

**LETÍCIA DIAS DOS ANJOS**

**MODELOS DE CRESCIMENTO DE PSICROTRÓFICOS EM  
DIFERENTES TEMPERATURAS E pH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2012.

Dr. Alexandre de Paula Peres UFLA

Dr. Sanderson L. Gonzaga de Oliveira UFLA

Dr. Cleube Andrade Boari UFVJM

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2013**

*Aos meus pais, José Alberto e Marisa, por todo apoio e esforço para que eu sempre estivesse bem; a minha irmã, Renata, por sempre me incentivar a lutar e buscar o meu melhor e, especialmente, ao meu noivo, Eduardo, pela motivação, pelo companheirismo ao longo de todo o processo do mestrado, mas, principalmente, pela paciência no convívio dos dias e noites cansativos de experimentos, quando minhas queridas bactérias não queriam colaborar.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Roberta, agradeço por se dispor a me orientar em um trabalho que, apesar de estar dentro da microbiologia, não faz parte de sua área atual de pesquisa, pela confiança e, principalmente, pela paciência para lidar com minha ansiedade e preocupação, até visualizar que seria possível concluí-lo.

Ao professor Dr. Alexandre por, apesar de trabalhar com modelagem para escoamento de fluido, ter aceitado o desafio e ter me coorientado na modelagem microbiana. Obrigada por toda a paciência de ficar horas aprendendo comigo como utilizar o programa, como interpretar os dados que ele gerava, como encontrar um coeficiente de regressão que convergia, quando tudo que tínhamos era a informação em que se usava o mesmo programa para obter modelos de predição.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade e convívio, quase que diário, que tornavam o trabalho mais prazeroso. Especialmente, à Maíra e ao Danilo, que me receberam e com muito desprendimento e me transmitiram seus conhecimentos e experiências adquiridas no laboratório, e pela paciência de sempre responderem a mais uma perguntinha.

À Mitah Technologies, pela confiança no meu trabalho, pela compreensão e apoio, por tornar esse trabalho possível e por todas as experiências vividas.

Aos meus pais, José Alberto e Marisa, por todo amor, dedicação e por toda a segurança emocional que me passaram. Vocês são minha base, minha essência.

À minha irmã, Renata, pelo incentivo, apoio, experiências transmitidas de quem já viveu a mesma situação, mas, principalmente, por, em nenhuma situação relacionada a este trabalho, ter piedade de mim, já que acredita que sou capaz.

Ao meu noivo, Eduardo, pelos conselhos, pelo apoio emocional nas decisões, pelas incansáveis palavras de motivação, pela valorização do meu trabalho. Não posso deixar de agradecer-lhe, também, pelas inúmeras vezes em que ouviu pacientemente minhas lamúrias de que minha bactéria não cresceu, de que meu experimento contaminou, de que meus modelos não convergiram. E pelo companheirismo de me trazer, me buscar e me esperar terminar algum procedimento no laboratório, sendo este à noite, de madrugada ou no fim de semana.

Aos amigos de Lavras, Rafa, Mateus, Fred, Rafael, Vlad, Diego, Betão, Gabriel, Fernando e Tiago, por entenderem minhas ausências e saídas em momentos de confraternização por ter que ir ao laboratório.

Por fim, quero expressar meus profundos agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Ninguém determina do princípio ao fim o caminho que pretende seguir na vida;  
só nos decidimos por trechos na medida em que vamos avançando.”

Michel de Montaign

## RESUMO

A conservação de alimentos perecíveis, como a carne, é um processo que surgiu concomitantemente à evolução humana, pois a necessidade do homem de se alimentar fez com que surgissem métodos de prolongar a vida útil dos alimentos. Dentre esses métodos, destaca-se a conservação pelo uso de frio, que conserva os alimentos porque, a baixas temperaturas, os micro-organismos têm suas taxas metabólicas reduzidas ou inibidas. Contudo, micro-organismos psicrófilos, que têm a capacidade de crescer em temperaturas que variam de 0 °C a 7 °C, podem contaminar e deteriorar alimentos refrigerados. Esse tipo de deterioração é responsável por perdas e, conseqüentemente, prejuízos para as indústrias processadoras e unidades transportadoras de carnes frigorificadas. Para minimizar tais perdas, esses setores almejam ferramentas que os ajudem a estimar a qualidade de seus produtos refrigerados, principalmente em situações fora da normalidade durante processamento ou transporte, conhecidas como abuso de temperatura. A microbiologia preditiva, por meio de modelos matemáticos, pode estimar o nível de contaminação microbiológica de alimentos em condições de armazenamento similares às condições experimentais. Desse modo, seu emprego pode ser útil para essas indústrias, facilitando a tomada de decisão e tornando possível a antecipação de problemas. Assim sendo, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver modelos de predição para *Pseudomonas fluorescens* e *Brochothrix thermosphacta*, em condições variadas de temperatura e pH. Para isso, por meio do acompanhamento das curvas de crescimento em várias condições de temperatura e pH, os dados de crescimento foram coletados em diferentes tempos. Esses dados foram ajustados pelos modelos primários de Baranyi e Roberts e Gompertz modificado, obtendo-se  $\mu_{max}$ , o qual foi ajustado pelo modelo de Ratkowsky para verificar a influência da temperatura e do pH neste parâmetro de crescimento, utilizando-se o programa DMFit 3.0. Os modelos primários apresentaram bons ajustes aos dados para os dois micro-organismos testados. Quanto à modelagem secundária, o modelo secundário gerado a partir do primário de Baranyi obteve melhor ajuste para *P. fluorescens*; para *B. thermosphacta*, os modelos secundários apresentaram bons ajustes. Para ambos os micro-organismos testados, a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento foi mais pronunciada que a influencia do pH, sendo que, no geral, a elevação da temperatura de refrigeração, para valores considerados de abuso, causou a elevação de  $\mu_{max}$  e depleção de  $\lambda$ , o que culmina em diminuição da vida útil do alimento.

Palavras-chave: Conservação, Frio, Microbiologia preditiva

## ABSTRACT

The preservation of perishable foods such as meat, is a process which appeared concurrently with human evolution, as the human need of feeding has spurred methods to prolong the shelf life of food. Among these methods, there is conservation through the use of cold canned foods because, at low temperatures, micro-organisms have their metabolic rates reduced or inhibited. However, psychrotrophic microorganisms which have ability to grow at temperatures ranging from 0 ° C to 7 ° C, can contaminate and spoil chilled foods. This type of deterioration is responsible for losses and consequently damage to processing plants and meat refrigerated carrier units. To minimize such losses, these sectors crave tools that help them estimate the quality of its products chilled, especially in situations outside normal processing or during transport, known as temperature abuse. The predictive microbiology, using mathematical models, can estimate the level of microbiological contamination of food in storage conditions similar to the experimental conditions. Thus, their use may be helpful for these industries, facilitating decision making and making it possible to anticipate problems. Therefore, this study aimed to develop a prediction model for *Pseudomonas fluorescens* and *Bochothrix thermosphacta* in varying conditions of temperature and pH. For that, by monitoring the growth curves in various conditions of temperature and pH growth data were collected at different times. These were fitted by primary Baranyi and Roberts and modified Gompertz obtaining  $\mu_{\max}$ , which was adjusted by Ratkowsky model to check influence of temperature and pH in the growth parameter, using the program DMFit 3.0. The primary models showed good fits to the data for the two microorganisms tested, as modeling the secondary secondary model generated from the primary Baranyi and Roberts best fit obtained for *P. fluorescens* to *B. thermosphacta* models side showed good fits. For both microorganisms tested the influence of temperature on growth parameters was more pronounced than the effect of pH, and in general the temperature rise refrigerating, values considered abuse, caused elevation of  $\mu_{\max}$  and depletion  $\lambda$ , the culminating in decreased useful life of food.

Keywords: Conservation, Cold, Predictive microbiology

## Sumário

PRIMEIRA PARTE.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Consumo de carne.....	17
2.2 Contaminação microbiológica da carne.....	19
2.2.1 Deterioração da carne.....	21
2.2.2 Micro-organismos deterioradores.....	24
2.3 Fatores que afetam o crescimento microbiano.....	27
2.3 Temperatura de armazenamento.....	28
2.3 pH.....	31
2.5 Microbiologia preditiva.....	33
2.5.1 Modelos preditivos.....	35
2.5.1.1 Modelos primários.....	39
2.5.1.1.1 Modelo de Gompertz.....	40
2.5.1.1.2 Modelo de Gompertz modificado.....	41
2.5.1.1.3 Modelo de Baranyi e Roberts.....	43
2.5.1.2 Modelos secundários.....	46
2.5.1.2.1 Modelo de Arrhenius.....	46
2.5.1.2.2 Modelo da raiz quadrada.....	47
2.5.1.2.3 Modelo de superfície de resposta.....	48

2.5.1.3 Modelos terciários.....	48
2.5.1.3.1 ComBase.....	49
2.5.1.3.2 DMFit.....	49
2.5.1.3.3 Sea Food Spoilage Predictor (SSP).....	50
2.5.1.3.4 Food Micromodel (FMM).....	50
2.5.1.3.5 Pathogen Microbial Model (PMP).....	51
2.5.1.3.6 Pseudomonas Predictor.....	51
2.5.1.3.7 Food Spoilage Predictor.....	52
2.5.2 Modelos de predição aplicados em carne e em produtos cárneos.....	52
REFERÊNCIAS.....	55
SEGUNDA PARTE - MODELAGENS PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DO CRESCIMENTO DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> EM DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURAS E pH.....	72
RESUMO.....	73
1 INTRODUÇÃO.....	75
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1 Local e condução do experimento.....	76
2.2 Micro-organismo utilizado.....	76
2.3 Padronização e manutenção do inóculo.....	77
2.4 Influência da temperatura de armazenamento e pH do meio no crescimento de <i>P. fluorescens</i> em caldo de carne.....	78
2.5 Análise dos dados de crescimento para a obtenção dos modelos.....	78
2.6 Validação dos resultados pela análise estatística dos modelos.....	79

2.7 Validação gráfica .....	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
3.1 Modelagem primária do crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em caldo de carne .....	81
3.2 Modelagem secundária do crescimento de <i>P. fluorescens</i> em caldo de carne .....	88
4 CONCLUSÃO .....	89
REFERÊNCIAS .....	91
APÊNDICE .....	93
TERCEIRA PARTE - MODELAGENS PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DO CRESCIMENTO DE <i>Brochothrix thermosphacta</i> EM DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURAS E pH .....	96
1 INTRODUÇÃO .....	99
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	100
2.1 Local e condução do experimento .....	100
2.2 Micro-organismo utilizado .....	100
2.3 Padronização e manutenção do inoculo .....	100
2.4 Influência da temperatura de armazenamento e do pH do meio no crescimento de <i>B. thermosphacta</i> em caldo de carne .....	101
2.5 Análise dos dados de crescimento para obtenção dos modelos .....	102
2.6 Validação dos resultados pela análise estatística dos modelos .....	103
2.7 Validação gráfica .....	104
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	105

3.1 Modelagem primária do crescimento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> em caldo de carne .....	105
3.2 Modelagem secundária do crescimento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> em caldo de carne .....	110
4 CONCLUSÃO .....	114
REFERÊNCIAS.....	115
APÊNDICE.....	116

**PRIMEIRA PARTE- INTRODUÇÃO GERAL**

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

As indústrias processadoras de produtos refrigerados e as empresas que trabalham com transporte de carga frigorificada (operadores logísticos, transportadores e armadores) são fortemente impactadas por perdas e os consequentes prejuízos ocasionados por falhas na cadeia do frio, ou seja, pela falta da manutenção da temperatura de refrigeração dentro de limites aceitáveis. Esses limites, de acordo com pela Portaria CVS-6/99, são toleráveis até 7 °C, sendo 4 °C a temperatura ideal de refrigeração.

O mercado de carnes sofre consideravelmente com essas perdas. Procurando diminuir estes prejuízos, a busca por ferramentas que auxiliem no controle da permanência da temperatura dentro de limites seguros é de grande interesse do mercado cárneo, já que, nestes limites, as transformações que levam à inutilização de alimentos devido à ação de agentes deteriorantes, como micro-organismos, enzimas e reações químicas, são reduzidas consideravelmente, permitindo maior tempo de preservação. Por outro lado, quanto maior for o tempo em que a carne estiver exposta a condições inadequadas de temperatura maiores as chances de deterioração.

Tem-se, então, instalada a necessidade de saber como os micro-organismos deteriorantes se comportam em diferentes temperaturas passíveis de serem encontradas no processamento e no transporte de carnes. Para solucionar essa situação, pode-se utilizar a microbiologia preditiva, cujo conceito baseia-se no conhecimento detalhado da resposta microbiana a mudanças ambientais, sendo possível prever, por meio de observações passadas, a resposta dos micro-organismos em um ambiente similar.

Por meio do acompanhamento das temperaturas de um produto estas podem ser correlacionadas com as curvas de crescimento dos micro-organismos deterioradores, por meio de modelos matemáticos, pelos quais será calculado o nível de contaminação deste alimento. Com este dado, é possível inferir sobre a sua qualidade e saber também se a sua vida útil foi prejudicada ou não.

Integrando o conhecimento científico da microbiologia preditiva com as unidades processadoras e distribuidoras de carnes e alimentos refrigerados em geral, pode-se ter maior controle e conhecimento sobre a qualidade da carne que se produz. Com isso:

- evitam-se perdas por meio da antecipação de problemas, pois, com o conhecimento do comportamento da microbiota deteriorante do produto, pode-se controlar melhor a temperatura, para que não chegue a um valor no qual permita a proliferação e deterioração do produto;

- evitam-se *recalls*, já que se pode ter uma melhor previsão da vida útil do alimento, antes que ele vá para os centros de distribuição. Além disso, se detectado que o alimento está impróprio para o consumo, pode-se determinar que o mesmo não seja entregue e que outro produto seja enviado em seu lugar, evitando-se, assim, potenciais prejuízos à imagem e/ou financeiros por quebra de contratos, por exemplo;

- pode-se garantir e demonstrar aos seus clientes (varejistas, *traders*, empresas de *food service*) a segurança do produto, bem como adotar uma postura pró-ativa em situações nas quais haja risco à sua integridade, em razão de falhas na manutenção da cadeia do frio.

Portanto, a utilização dos modelos preditivos ajuda na tomada de decisão e na antecipação de problemas para evitar perdas pelas indústrias

processadoras de alimentos e pelos operadores logísticos que, além de buscarem a minimização de prejuízos, almejam alcançar isso de forma eficiente e sem perda de tempo. Para agilizar esse processo, estes modelos podem ser integrados a programas computacionais, em que, por meio da captação de temperatura do ambiente, calcula-se o nível populacional por meio dos modelos de predição embarcados nestes programas.

Com base no exposto, esta pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar e modelar o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* e *Brochothrix thermosphacta*, em diferentes temperaturas e pH.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Consumo de carne**

O consumo da carne pelo ser humano é tão antigo quanto a sua existência. Quando o homem primitivo das cavernas descobriu o fogo, descobriu muito mais do que uma simples fonte de luz e de calor; ele certamente percebeu que a carne, ao ser passada pelo fogo, tinha seu sabor alterado e sua durabilidade aumentada. Na atualidade, a tecnologia permite a conservação, a seleção e o desenvolvimento cada vez melhores (FONSECA, 2004).

A carne bovina é um alimento de excelentes qualidades nutricionais. Na sua composição encontram-se proteínas de alto valor biológico, associadas a teores significativos de vitaminas, especialmente as do complexo B, juntamente com importantes minerais, particularmente o  $Fe^{++}$ , que tem uma forma altamente biodisponível (PENSEL, 1998). Além de fonte de nutrientes, quantidade substancial de evidências apoia o papel da carne vermelha magra como moderador positivo do perfil lipídico, e estudos recentes a identificam como fonte alimentar de anti-inflamatório de cadeia longa (LC) n 3 PUFAs e ácido

linoleico conjugado (CLA). Assim, influencia positivamente a entrada de nutrientes e perfil de ácidos graxos e impacta favoravelmente a saúde, a longo prazo. Mesmo com a realização de pesquisas recentes as quais associam o consumo de carne vermelha ao risco de doenças cardiovasculares e ao câncer de cólon (MCAFEE et al., 2010), vinculando papel negativo da carne vermelha à saúde, este alimento ainda é altamente consumido no mundo todo (OLAOYE, 2011). Em 2011, o consumo *per capita* de carne bovina no Brasil foi de, aproximadamente, 40 kg/ano (ABIEC, 2012), ficando atrás apenas de Uruguai e Argentina, onde o consumo *per capita* foi de 60 kg/ano e 54 kg/ano, respectivamente, e à frente de Estados Unidos, Austrália e Paraguai, com 38 kg/ano, 35 kg/ano e 34 kg/ano por pessoa (UNIEC, 2012).

Nas últimas décadas, os consumidores têm demonstrado crescente interesse, tanto pela produção de alimentos de origem animal quanto pela qualidade dos alimentos em geral (MORKBAK; NORDSTRÖM, 2011). A satisfação dos consumidores ao comer carne é uma resposta complexa, com base em avaliações objetivas e emocionais do produto. Além do preço do produto, que apesar de simples é fator-chave de compra, especialmente para os jovens, características de qualidade, tais como segurança e salubridade, são critérios muito importantes nos dias de hoje, além de sabor e conveniência (HOCQUETTE et al., 2012). O mesmo foi observado também por Peng et al. (2011), que ressaltaram que, com a melhoria dos padrões de vida, as pessoas têm dado mais atenção à segurança e à qualidade da carne.

Algumas dessas características de qualidade podem ser facilmente avaliadas pelos consumidores quando come (como gosto), mas, para outras (como a segurança ou salubridade cuja importância relativa tem aumentado), o consumidor deve confiar em marcas de qualidade e/ou na origem do produto (HOCQUETTE et al., 2012).

Nota-se que a segurança da carne é considerada pré-requisito para os consumidores (BARCELLOS et al., 2010). Assim, a indústria processadora da carne necessita de tecnologias eficientes para assegurar a qualidade da carne, no intuito de satisfazer às exigências da expansão e segmentação do mercado (PENG et al., 2011).

## **2.2 Contaminação microbiológica da carne**

A carne representa complexo ecossistema com características químicas e físicas particulares, as quais permitem a colonização e o desenvolvimento de grande variedade de organismos (ERCOLINI et al., 2006).

A carne bovina é considerada meio de cultura ideal para o desenvolvimento microbiano (PIERSON; CORLETT JR., 1992), pois fornece elementos essenciais, como vitaminas, em maior quantidade B2 e B12, presentes apenas em alimentos de origem animal e que são responsáveis pela síntese das células vermelhas do sangue e manutenção do sistema nervoso central; gorduras, variando de 5% a 25%; proteínas, que fornecem ao organismo humano todos os aminoácidos necessários e em quantidade adequada e minerais (BECKE; KIEL, 2011), além de apresentar alta atividade de água (aw). Além disso, seu pH é favorável (5,6) ao crescimento da maioria dos micro-organismos (PIERSON; CORLETT JR., 1992), o que a torna um alimento altamente susceptível à proliferação de bactérias deteriorantes (MAYR et al., 2003).

Os músculos de um animal saudável são considerados estéreis, mas o abate e o processo de despostejamento da carcaça fornecem às bactérias oportunidade de colonizar a superfície da carne (OLAOYE, 2011).

Varias são as fontes de micro-organismos que contaminam a carne, inicialmente durante a sangria, podendo alcançar os músculos dos animais devido ao uso de equipamentos não esterilizados e introduzir micro-organismos

no sistema vascular que podem se espalhar pelo corpo do animal, devido à persistência curta do fluxo de sangue após a sangria (HEDRICK et al., 1993). Além disso, contaminações posteriores podem ocorrer em vários estágios, incluindo corte, processamento, armazenamento e distribuição da carne (FLEET, 1999). Ferguson e Warner (2008) afirmam que as causas que geralmente afetam a qualidade da carne é o manejo pré-abate, mas as condições dos abatedouros, o tempo de exposição à temperatura ambiente, as condições de estocagem e a distribuição nos locais de comercialização também são fatores importantes e determinantes, no que diz respeito à qualidade microbiológica da carne.

Assim, os micro-organismos que podem vir a contaminar a carne durante essas etapas podem ser originários do trato gastrointestinal do animal, assim como do contato com o meio ambiente. Em vários estudos foi demonstrada a associação da presença de *Enterobacteriaceae* em carnes e o contato com as superfícies de trabalho. Bactérias psicotróficas são também isoladas de superfícies de materiais e equipamento no matadouro, assim como de carcaças e carne manipulada em todas as etapas do processamento (NYCHAS et al., 2008).

As contaminações que ocorrem durante o processamento promovem alterações no valor nutricional e nas características sensoriais (cor, odor, sabor e textura) (SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL, SENAI, 1999), alterações essas oriundas tanto das condições de manejo dos animais no pré-abate quanto por processos bioquímicos e enzimáticos que ocorrem durante a estocagem (ZAKRYS, 2009), gerando perdas econômicas e consequências na saúde pública, devido à presença de micro-organismos nos alimentos. Essas alterações dependem das espécies e da quantidade de micro-organismos presentes, que irão determinar se a contaminação causará doença ou deterioração microbiana (FLEET, 1999). Se a carne estiver contaminada com micro-organismo patogênico, sua ingestão pode resultar em risco à saúde do

consumidor; se o micro-organismo for deteriorador, pode resultar em perda de qualidade e diminuição da vida útil do período de conservação (FRITZEN et al. 2006). Para aumentar a vida útil de carne em condições de armazenamento, uma medida de controle adicional adotada é reduzir a carga microbiana inicial tanto quanto possível, antes do armazenamento refrigerado. Vários métodos podem ser aplicados para reduzir a contaminação bacteriana inicial de carcaças, incluindo, principalmente, a lavagem com água ou desinfetantes e irradiação (GARCIA et al., 1995).

Contudo, isso não exclui a avaliação da qualidade microbiológica de carnes, a qual é essencial tanto para assegurar a integridade da saúde do consumidor quanto para evitar perdas e prejuízos às unidades produtoras, processadoras e distribuidoras desse alimento. Essa avaliação da qualidade microbiológica das carnes está baseada em parâmetros higiênico-sanitários, os quais permitem uma avaliação global da higiene e da limpeza durante o processamento, o transporte e o armazenamento e da provável vida útil do produto (FROTA, 2009).

### **2.2.1 Deterioração da carne**

A deterioração de carnes pode ser considerada fenômeno ecológico que engloba mudanças nos substratos disponíveis, que ocorrem por meio da proliferação da microbiota durante o armazenamento do produto. Contudo, a percepção dessas mudanças pelos consumidores é um julgamento subjetivo, já que ela pode ser influenciada por aspectos econômicos, sociais, conhecimento, acuidade sensorial do indivíduo e intensidade de deterioração (NYCHAS; MARSHALL; SOFOS, 2007).

Os tipos mais comuns de deterioração de carnes podem ser classificados de acordo com o ambiente que envolve estes produtos e são provocados por

bactérias, fungos filamentosos ou leveduras. Por exemplo, em condições de aerobiose, as bactérias produzem modificações na cor, no sabor, no aroma e na gordura da carne (PIERSON; CORLETT Jr., 1992). Essas modificações são consequência, principalmente, de dois tipos de alterações causadas pelos microorganismos sobre os aminoácidos durante a decomposição da carne: a descarboxilação e a desaminação (BANWART, 1989).

Dessas reações de descarboxilação surgem as aminas biogênicas, formadas devido a reações enzimáticas da atividade microbiana durante o processo de degradação, sendo utilizadas como medida da qualidade e segurança de carnes e produtos cárneos (RUIZ-CAPILLAS; PINTADO; JIME'NEZ-COLMENERO, 2012). Assim, a descarboxilação microbiana de aminoácidos pode formar histamina, cadaverina, lisina, tiramina e putrescina, a qual serve como precursora para a espermina e a espermidina (VINCI; ANTONELLI, 2002). Além destas, octopamina e dopamina foram encontradas na carne e em produtos de carne e peixe (NAILA et al., 2010).

Jastrzebska (2012), em estudo sobre aminas biogênicas em diferentes tipos de carnes, observou que as aminas mais abundantes em amostras de carne fresca foram espermina e espermidina. As maiores quantidades destas aminas foram detectadas em carne de aves, enquanto os menores teores foram detectados em carne de porco. Putrescina e cadaverina foram detectadas em todas as amostras de carne (bovina, suínas e aves). Os dados dessa pesquisa indicam ainda que todas as amostras continham, predominantemente, putrescina e menores quantidades de cadaverina. A histamina foi detectada apenas na amostra de carne de aves, enquanto a tiramina, em aves e carne de porco. A identificação dessas aminas biogênicas, além de servir como indicador de qualidade em alguns alimentos, é importante, do ponto de vista de saúde pública, já que a ingestão de alimentos que contêm elevadas concentrações de aminas biogênicas pode representar perigo para a saúde, devido aos efeitos tóxicos

diretos desses componentes (RUIZ-CAPILLAS; PINTADO; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2012). As reações de desaminação têm, principalmente, amônia como produto final (TERRA, 2005), responsável por elevar o pH do meio.

Essas modificações, geradas pela produção de aminas biogênicas durante a decomposição da carne, nem sempre são evidentes e consumidores concordam que descoloração, fortes odores indesejáveis e desenvolvimento de limo constituem os principais critérios qualitativos de rejeição da carne (NYCHAS et al., 2008). Esses odores desagradáveis são provenientes, principalmente, do acúmulo dessas aminas até níveis que são detectados sensorialmente como odores pútridos/sulfurosos (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996).

Segundo ROÇA (2004), quando as contagens de aeróbios mesófilos estão na faixa de  $10^6$  UFC/g, geralmente ocorre a descoloração da superfície da carne. Entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/g, surgem odores estranhos; entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/g, ocorrem alterações indesejáveis de sabor e, em contagens por volta de  $10^9$  UFC/g, aparece o limo superficial, devido à presença de polissacarídeos sintetizados pelas bactérias, como, por exemplo, *Alcaligenes viscolactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas* spp e *Lactobacillus* (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005). A partir dessa mesma densidade populacional ( $10^9$  UFC/g) inicia-se a proteólise das proteínas miofibrilares e enzimas microbianas (JAY, 2005). Para Gill, McGinnis e Bryant (1998), quando a contaminação atinge  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, a formação de limo já é evidente. SILVA (1995) considerou carnes com contagens de até  $10^4$  UFC/g aceitáveis, entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/g questionáveis e, acima desses valores, carne deteriorada.

Para os consumidores, a deterioração é qualquer modificação no alimento que o torne rejeitado sobre o ponto de vista sensorial (GRAM et al., 2002). Em vários trabalhos correlaciona-se o nível populacional em que os

consumidores percebem as mudanças organolépticas e rejeitam esses alimentos para estimar, por meio da microbiologia predita, a vida útil de um alimento.

Assim, a deterioração de alimentos é um processo complexo e quantidade expressiva de alimentos é perdida pela deterioração microbiana, mesmo com modernas técnicas de preservação atuais (GRAM et al., 2002). Além de levar a perdas econômicas, a deterioração afeta negativamente a marca comercial do produto, prejudicando a indústria da carne (HERNANDEZ-MACEDO; BARANCELLI; CONTRERAS-CASTILLO, 2011).

A fim de evitar essas perdas é de grande importância para a indústria da carne uma avaliação objetiva da deterioração, o que requer métodos analíticos rápidos ou ferramentas para identificar os indicadores de deterioração, como descoloração, odor e sabor desagradáveis, e formação de limo, para assim ser possível determinar o tipo de processamento necessário para a matéria-prima e para prever a vida útil restante dos seus produtos (NYCHAS et al., 2008).

### **2.2.2 Micro-organismos deterioradores**

O conhecimento das populações microbianas associadas à deterioração da carne é extenso (NYCHAS et al., 2008). Algumas espécies de bactérias são específicas da carne, uma vez que só podem ser isoladas a partir deste substrato, matadouros e instalações conexas (LABADIE, 1999). Fontes destes micro-organismos abrangem o trato gastrointestinal e as superfícies externas do animal, incluindo o ambiente com que o animal teve contato, antes ou durante o abate (NYCHAS et al., 2008).

As bactérias mais comumente envolvidas na deterioração da carne são *Pseudomonas* spp, *Enterobacterias*, *Brochothrix thermosphacta* e bactérias lácticas (LAB), as quais contribuem para a deterioração, dependendo, em grande parte, da disponibilidade de oxigênio (DAINTY; MACKAY, 1992). Elas foram

designadas como micro-organismos de deterioração efêmera, pois têm a capacidade de, eventualmente, tornarem-se dominantes entre a microbiota deteriorante (NYCHAS et al., 1998). As estratégias de crescimento e sobrevivência desenvolvidas por essas bactérias de deterioração efêmera (ESO) são influenciadas por dois principais determinantes ambientais que são: i) presença de micro-organismos competidores e ii) estresse (parâmetros intrínsecos e extrínsecos) (BODDY; WIMPENNY, 1992).

Dentre as pseudomonas, *Pseudomonas fluorescens* abrange um grupo de saprófitas comuns, não-patogênicos, que colonizam água, solo e ambientes de superfície da planta. Como o próprio nome indica, produzem um solúvel, pigmento esverdeado fluorescente, especialmente sob condições de baixa disponibilidade de ferro. É um aeróbio obrigatório, exceto para algumas estirpes, que podem utilizar  $\text{NO}_3$  como um receptor de elétrons no lugar de  $\text{O}_2$ , e move-se por meio de múltiplos flagelos polares. *P. fluorescens* tem requisitos nutricionais simples, crescendo bem em vários alimentos (PALLERONI, 1984). *Brochothrix thermosphacta* é uma bactéria gram-positiva comumente associada à deterioração de carnes. Sua morfologia altera entre cocobacilos a cadeias de hastes curtas, durante o crescimento. Cresce em carnes refrigeradas, tanto em aerobiose quanto em condições mínimas de oxigênio (PENNACCHIA; ERCOLINI; VILANI, 2009).

Muitos trabalhos já foram e, até hoje, são realizados com o objetivo de detectar micro-organismos deteriorantes em carnes. Dentre eles pode-se citar o de Franco e Landgraf (1996), que sugerem que a temperatura e a umidade da superfície da carne e do ar podem favorecer o crescimento de micro-organismos produtores de mucosidade ou limo superficial, e que essas alterações podem ter como responsáveis espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* e alguns *Lactobacillus*. Gill e Newton (1978) mostraram que as *Pseudomonas* spp. crescem mais rápido que

os outros micro-organismos da carne, em temperaturas entre 2 e 15 °C, sendo este um micro-organismo predominante em carnes e que pode produzir odores indesejáveis (ESMER et al., 2011). Lebert, Begot e Lebert (1998) ressaltam que *Pseudomonas fluorescens* representa mais de 60% do número inicial das pseudomonas em carne armazenada a frio e este número pode chegar a 90% do total de bactérias no ponto de deterioração. Bagamboula, Uyttendaele e Debevere, (2003) relatam que a deterioração de carnes refrigeradas é causada, em parte, por espécies de pseudomonas que são responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis, descoloração, produção de gás e de limo.

O gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonadaceae* sendo bastonetes gram-negativos aeróbios, não formadores de esporos, móveis devido à presença de flagelo polar e são catalase e oxidase positivos. As espécies deste gênero se caracterizam por sua incapacidade de fermentar os açúcares, embora a maioria das cepas degrade oxidativamente a glicose. São bactérias nutricionalmente versáteis, capazes de utilizar ampla variedade de substratos, cuja temperatura ótima de crescimento varia entre 30 °C e 37 °C, embora se multipliquem em temperaturas baixas (KISKA; GILLIGAN, 1999).

Outro exemplo pode ser encontrado no trabalho de Russo et al. (2006), que verificaram que as bactérias deteriorantes associadas com a deterioração de carne bovina foram *B.thermosphacta*, *Pseudomonas* spp, *Enterobacteriaceae* e bactérias do ácido lático.

Borch, Kant-Muermans e Blixt (1996) encontraram que o psicotrófico *B. thermosphacta* frequentemente representa significativa porção da microbiota deterioradora da carne armazenada aerobicamente ou embalada a vácuo em condições de refrigeração e este é, ocasionalmente, o micro-organismo dominante.

Esmer et al. (2011) também observaram o crescimento de *B. thermosphacta* na presença de oxigênio, causando a deterioração de carnes. Esse

micro-organismo, bacilo gram-positivo, não pigmentado, catalase positivo, imóvel, aeróbio e aeróbio facultativo que não forma cápsula e nem esporos, apresenta temperatura ótima de crescimento entre 20-25 °C, podendo multiplicar-se também em baixas temperaturas (PETER; SNEATH; JONES, 1986). Em aerobiose ou em concentrações limitadas de oxigênio, é capaz de se multiplicar e produzir componentes como acetoína, ácidos acético, isobutírico, 2-metil-butírico, isovalérico, ácido láctico, dióxido de carbono e etanol, que contribuem para o surgimento de um tipo de deterioração característica da carne (RUSSO et al., 2006), podendo, ainda, ocorrer descoloração e produção de gás (XU et al., 2010).

Nota-se que a vida útil de carne bovina é extremamente dependente do número e do tipo de bactéria inicialmente presente e seu crescimento futuro nas condições ecológicas aplicadas durante a armazenagem, particularmente temperatura, pH e atmosfera gasosa (RUSSO et al., 2006). Todos estes fatores, sozinhos ou em combinação, podem resultar em mudanças na coloração (FAUSTMANN; CASSENS, 1990), no odor, na textura e no sabor da carne (LAMBERT; SMITH; DODDS, 1991).

Portanto, a deterioração inesperada de carne, ocasionada por esses micro-organismos, pode levar ao desperdício de alimentos e à consequente perdas econômicas para as indústrias, bem como à perda de confiança dos consumidores (NYCHAS; MARSHALL; SOFOS, 2007). Visto isso, métodos de conservação de alimentos são cada vez mais valorizados.

### **2.3 Fatores que afetam o crescimento microbiano**

Sabendo-se que a deterioração é um fenômeno ecológico que inclui alteração em substratos por bactérias, a prevalência desses micro-organismos na carne depende de fatores que permaneçam durante o armazenamento e o

transporte desse alimento, dando condições para a proliferação dos micro-organismos deteriorantes (NYCHAS; MARSHALL; SOFOS, 2007).

Assim, fatores como pH e temperatura de estocagem vão determinar a prevalência e a multiplicação microbiana em alimentos

### **2.3 Temperatura de armazenamento**

Com o aumento da população mundial e a necessidade de fornecer alimentos frescos e saudáveis, a conservação de alimentos se torna cada vez mais necessária, a fim de aumentar a vida útil e a manutenção do valor nutricional, da textura e do sabor dos alimentos (KAALE, 2011).

Neste âmbito, o armazenamento de alimentos utilizando baixas temperaturas é, de longe, a medida de preservação de alimentos frescos mais comumente utilizada durante a produção e a distribuição (ERCOLINI et al., 2009). A utilização do frio, como as temperaturas de refrigeração e o congelamento, é considerada o método mais eficaz para retardar ou inibir o crescimento de micro-organismos em produtos cárneos, durante o transporte ou o armazenamento e pode ajudar a manter a segurança e prolongar a vida útil desses produtos (AL-JASSER, 2012). Considera-se ideal a temperatura de refrigeração de 4 °C e de congelamento de -18 °C.

Basicamente, o frio conserva os alimentos porque retarda ou inibe a multiplicação microbiana (JAY, 2005). Isso ocorre porque temperaturas de refrigeração diminuem a velocidade de reações químicas e bioquímicas, a evaporação de água ou qualquer outro processo que possa reduzir a qualidade ou a vida útil do produto (ERCOLINI et al., 2009). Além disso, esta conservação é possível também, pois, a baixas temperaturas, a fluidez da membrana é diminuída e, com isso, diminui também a velocidade das reações enzimáticas responsáveis pelo metabolismo microbiano. Contudo, micro-organismos

psicotróficos conseguem se desenvolver a baixas temperaturas, pois têm habilidade de modificar sua membrana citoplasmática, aumentando a quantidade de ácidos graxos insaturados, que mantêm esta membrana em um estado semifluido, facilitando, assim, o transporte de nutrientes e enzimas (MADIGAN et al., 2010).

Embora a maioria dos países estabeleça regulamentos com limites de temperatura máxima para armazenamento sob refrigeração, na prática, estas são frequentemente violadas. A carne é considerada refrigerada quando é mantida entre -1,5 a 7 °C, durante todo o tempo após o processo de *post-mortem* (LUCHIARI FILHO, 2006). Mesmo respeitando esses limites de refrigeração, a vida útil da carne refrigerada em aerobiose não é muito longa, não mais que uma ou duas semanas, e depende, fundamentalmente, da concentração inicial de bactérias e de diversos fatores, como a temperatura de armazenamento, o seu pH, a tensão de oxigênio e o potencial redox (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005).

Em muitos estudos tem sido mostrado que condições de temperatura acima de 10 °C não são incomuns durante o transporte, o armazenamento no varejo e o manuseio pelo consumidor (GIANNAKOUROU et al., 2001). Tais abusos de temperatura, durante qualquer fase da cadeia de frio, podem resultar em inesperada perda de qualidade e diminuição significativa da vida útil da carne refrigerada. Sendo assim, a temperatura parece ser o fator mais importante que influencia a deterioração bem como a segurança de carnes (KOUTSOUMANIS; TAOUKIS, 2005).

Portanto, para evitar essa deterioração e garantir a segurança, a manutenção da temperatura em toda a cadeia de comercialização da carne deve ser constante para garantir que o produto mantenha temperatura uniforme.

Lundgren et al. (2009) também consideram a importância de não se quebrar a cadeia do frio, visto que qualquer falha nesta cadeia pode

comprometer a qualidade dos produtos, pois as velocidades das reações químicas, bioquímicas e microbiológicas são relacionadas diretamente com a temperatura, influenciando a sanidade, a qualidade nutricional e a qualidade sensorial dos produtos refrigerados. Ressaltam também que um aspecto importante a ser observado na comercialização de produtos de origem animal é a manutenção da temperatura adequada para cada alimento. Carnes, pescados, leites e derivados, quando expostos a temperaturas inadequadas, alteram-se rapidamente, sobretudo em regiões tropicais, onde, durante o verão, as temperaturas são elevadas, exigindo controle rigoroso para garantir a qualidade desses produtos.

A responsabilidade de manter essa cadeia do frio se estende também aos consumidores. Pesquisa realizada na Coreia indicou que 50,3% dos consumidores usam o porta-malas do carro para o transporte de alimentos refrigerados comprados em grandes descontos e lojas de departamento (KIM et al., 2011). No entanto, como consequência da exposição prolongada do carro à luz solar direta, esse comportamento pode levar ao crescimento de micro-organismos, devido ao aumento de temperatura no interior do alimento. Embora a natureza perigosa deste comportamento seja questionável, atualmente, existem apenas informação e quantificação limitadas do seu risco associado (KIM et al., 2013).

Temperatura abaixo ou acima da faixa ótima para o crescimento microbiano terá ação preventiva no futuro. Para a carne fresca, a refrigeração, incluindo armazenamento abaixo ou acima do ponto de congelamento, tem sido o método de preservação tradicional (BEAUFORT et al., 2009). Porém, mesmo sob baixas temperaturas, alguns micro-organismos podem se desenvolver nas carnes.

Assim, muitas alterações indesejáveis podem ocorrer durante a refrigeração, devido ao crescimento microbiano e à oxidação lipídica

(SALLAM; SAMEJIMA, 2004). A capacidade desses micro-organismos psicotróficos de crescer em temperaturas de refrigeração torna o controle da qualidade e da sanidade, pela indústria da carne, um desafio (HERNANDEZ-MACEDO; BARANCELLI; CONTRERAS-CASTILLO, 2011).

Portanto, diante do cenário atual, com o aumento do consumo em massa de carne fresca e de produtos cárneos, bem como com os novos padrões de consumo, como redução do tempo de cozimento com mínima perda de qualidade e cozimento em micro-ondas, tem acentuado a necessidade de controle constante e sistemático da temperatura de produtos de carne crua, pela sua distribuição na cadeia do frio, do ponto de produção para o consumidor final (KOUTSOUMANIS; TAOUKIS, 2005).

### **2.3 pH**

A qualidade da carne percebida pelos consumidores é uma combinação de suculência, sabor e odor (LANDIM et al., 2011). Esses fatores podem ser influenciados por parâmetros intrínsecos, como idade, sexo, genética dos animais, bem como pelo pH final da carne (FERRÃO et al., 2009).

Alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ) são os mais sujeitos à multiplicação microbiana, tanto de espécies patogênicas quanto de espécies deteriorantes. Já nos alimentos ácidos ( $\text{pH}$  entre 4,0 e 4,4), há predominância de crescimento de leveduras, de fungos filamentosos de algumas poucas espécies bacterianas, principalmente bactérias lácticas. Nos alimentos muito ácidos ( $\text{pH} < 4,0$ ), o desenvolvimento microbiano fica restrito quase que exclusivamente a fungos e a leveduras (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Além dessa classificação, cada micro-organismo apresenta um pH ótimo de crescimento e Baka et al. (2013) comprovaram, em seu trabalho, que a taxa de crescimento é máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) no valor do pH ótimo e é bem menor em valores considerados de estresse.

O pH final da carne pode variar entre 5,5 e 7,0, sendo este valor altamente dependente da quantidade de glicogênio presente no tecido no momento do abate, uma vez que, após o abate, ele se transformará em ácido láctico (CARDENAS; GIANNUZZI; ZARITZKY, 2008). Esse valor final de pH influenciará diretamente o crescimento microbiano. Uma vez que, em valores baixos de pH, os ácidos fracos encontram-se na forma não dissociada e conseguem penetrar na membrana plasmática do micro-organismo, já no interior da célula esse ácido dissocia-se e há, então, gasto energético (ATP) para expulsão de prótons e regularização do pH celular, resultando em morte celular (AXE; BAILEY, 1995). Por outro lado, quando o alimento é mantido em aerobiose, é normal que o pH aumente, coincidindo com contagens totais superiores a  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> e sua alteração. Estas mudanças se devem, possivelmente, à formação de substâncias básicas derivadas do crescimento, principalmente, de *Pseudomonas* (MANO; ORDONEZ, GARCIA de FERNANDO, 2002).

Sabe-se que o ácido orgânico tem efeito antimicrobiano, causado, principalmente, pela ação da fração não dissociada do ácido, em vez de íons de hidrogênio. É devido ao aumento da porção não dissociada de ácido fraco que, quando presente no estado não carregado, tem maior atividade de penetrar nas células do que os produtos dissociados (GIANNUZZI; ZARITZKY, 1996). Neste aspecto, Tienungoon et al. (2000) relatam que os ácidos orgânicos acentuam a inibição da taxa de crescimento bacteriano e a magnitude desta inibição é mais dependente da concentração de ácido não dissociado.

Um exemplo do efeito do pH sobre a cinética microbiana em carne pode ser visto no trabalho de Koutsoumanis et al. (2006) que, embora tenham testado faixa de pH estreita (5,34 a 6,13), puderam observar efeito significativo do pH da carne moída sobre a cinética de crescimento de *Pseudomonas*, *B. thermosphacta* e bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Relatam, ainda, os autores que, em

carne, pequenas diferenças no pH podem se traduzir em diferenças significativas na concentração de lactato, que afeta o crescimento de *Pseudomonas*, a qual é sensível ao ácido láctico. Já as bactérias do ácido láctico não tiveram cinética de crescimento afetadas pelo pH da carne, o que pode ser explicado pela alta tolerância ao ácido dessas bactérias, comparadas às outras bactérias deterioradoras (BLIXT; BORCH, 2002).

Pode-se também observar o efeito conservante do pH na carne aliado à atividade de água ( $a_w$ ), visto que a redução da  $a_w$  no alimento pode ser atribuída à queda dos valores de pH, pois a capacidade de retenção de água das proteínas da carne diminui na medida em que o pH se aproxima do seu ponto isoelétrico, acelerando a desidratação e, conseqüentemente, reduzindo a  $a_w$ . O crescimento e o metabolismo microbiano exigem a presença de água sob a forma disponível, uma vez que a água ligada a macromoléculas por forças físicas não está disponível para participar de reações químicas, não podendo ser aproveitada pelos micro-organismos.

Assim, com a determinação do pH nos alimentos, é possível avaliar a microbiota predominante, o potencial e a provável natureza dos processos de deterioração que eles poderão vir a sofrer, como também o tipo, a intensidade e os parâmetros do processamento térmico a que devem ser submetidos.

## **2. 5 Microbiologia preditiva**

A microbiologia preditiva é uma área da microbiologia de alimentos que atenta para prever a evolução quantitativa da população microbiana ao longo do tempo. Isto é conseguido por meio dos modelos que incluem os mecanismos que governam a dinâmica populacional (FERRER et al., 2009). Estes modelos são muito utilizados por constituírem ferramenta baseada nas características dos

produtos e condições de processamento e estocagem para prever a qualidade e a segurança microbiológica desses produtos (PSOMAS et al., 2011)

A chave da microbiologia preditiva é que o comportamento da população microbiana e seu efeito no ambiente à sua volta podem ser previstos, uma vez que o seu estado em determinado momento é conhecido. A avaliação deste estado envolve a manipulação e o monitoramento do sistema durante tempo limitado, o uso de base de dados e a síntese de informação em modelo matemático (FERRER et al., 2009).

A microbiologia preditiva tem provado seu valor e sua utilidade para descrever, baseado em modelos matemáticos, o crescimento microbiano em alimentos, desde a sua obtenção (MCDONALD; SUN, 1999). A avaliação da evolução dos micro-organismos que contaminam naturalmente os alimentos deve levar em conta a variedade de fatores que influenciam o comportamento microbiano, como fatores do ambiente e características dos alimentos. A aproximação probabilística do crescimento microbiano consiste em levar em conta essas fontes de variação com os modelos de microbiologia preditiva para permitir a previsão da distribuição da contaminação microbiana dos alimentos, durante seu armazenamento (DELIGNETTE-MULLER et al., 2006).

A aplicação de modelos preditivos tem sido marcadamente assistida na gestão moderna da segurança alimentar (GORRIS, 2005), sendo muito úteis para quantificar as alterações nos alimentos, devido à atividade microbiana. Esses modelos são expressões matemáticas que descrevem a inativação ou o aumento da população microbiana nos alimentos, em função de relevantes parâmetros intrínsecos e extrínsecos, geralmente em escala macroscópica (MARKS, 2008).

O sucesso na validação de um modelo de microbiologia preditiva é muito útil para a avaliação da qualidade e da segurança alimentar (MCMEEKIN et al., 2006). São notórios os exemplos da aplicação da microbiologia preditiva

no contexto industrial em processo, para a gestão da segurança do risco para o consumidor (MEMBRE; LAMBERT, 2008).

Para facilitar esta gestão da segurança, os modelos preditivos podem vir embarcados em softwares. Ingham et al. (2009) relatam que ferramentas computacionais, com embasamento científico, para prever o crescimento de micro-organismos em carne fresca são extremamente importantes para informar aos processadores a necessidade de avaliar os desvios no processamento da carne, permitindo que as partes interessadas na cadeia alimentar tenham um melhor controle de perigos microbiológicos (DELHALLE et al., 2012).

### **2. 5.1 Modelos preditivos**

Modelos matemáticos têm sido extensivamente utilizados em ciência e engenharia, com a intenção de melhorar o entendimento do comportamento dos sistemas, explorar novos conceitos teóricos, prever a performance dos sistemas e, em um grande número de casos, ajudar na solução dos problemas práticos (MASON, 2006). No ramo da biologia combinam-se abordagens teóricas e experimentais, atribuindo papel central à modelagem matemática (STELLING, 2004).

Os modelos específicos de microbiologia preditiva são ferramentas essenciais para modelar o crescimento bacteriano na avaliação quantitativa do risco microbiano. Vários modelos de microbiologia preditiva estão disponíveis (POUILLOT; LUBRAM, 2011) e formam a base para a adoção de estratégias na área de segurança alimentar, cujo objetivo é prever quando e em quais circunstâncias o número microbiano crescerá a um nível que possa ameaçar a saúde pública (SOBOLEVA; PLEASANTS; ROUX, 2000).

Os microbiologistas de alimentos têm procurado modelos eficientes para o crescimento microbiano que possam permitir a previsão de alterações

microbiológicas no armazenamento (BARANYI; ROBERTS, 1994). Eles utilizam parâmetros para caracterizar o crescimento microbiano em alimentos, sendo eles: número inicial de células ( $N_0$ ), número máximo de células ( $N_{max}$ ), taxa específica de crescimento máxima ( $\mu_{max}$ ) e fase lag ( $\lambda$ )(LIU; YANG; LI, 2006). Estes parâmetros podem ser facilmente extraídos a partir de curva de crescimento, a qual apresenta, basicamente, três fases: uma fase de retardamento, durante a qual as células microbianas se adaptam ao seu novo ambiente, seguida por uma fase de crescimento exponencial, durante o qual as células se multiplicam de forma exponencial e, finalmente, uma fase estacionária, quando a densidade populacional máxima é atingida. As condições ambientais, a composição do alimento e o estado de crescimento dos microorganismos (lag, fase exponencial estacionário) podem afetar a taxa de crescimento (ISABELLE; ANDRE, 2006). Essas fases de crescimento estão ilustradas na Figura 1.

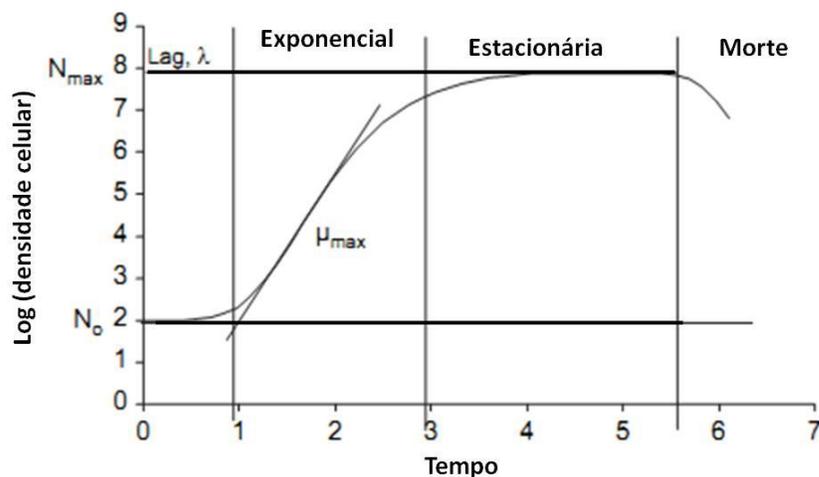


FIGURA. 1. Curva de crescimento.  $\lambda$  fase lag,  $\mu_{max}$  taxa específica máxima de crescimento,  $N_0$  concentração inicial,  $N_{max}$  população bacteriana máxima.

Segundo McMeekin e Ross (2002), o conhecimento das respostas de crescimento microbiano a fatores ambientais, medidos pelos parâmetros citados acima, é expresso em termos quantitativos, por equações matemáticas (modelos). Pode-se dizer que um modelo é um sistema simplificado que utiliza combinações de descrições, por meio de funções ou equações matemáticas e com condições iniciais específicas (ALVARENGA, 2008), podendo ser aplicado para calcular o número de micro-organismos presentes no alimento (WIJTZES et al., 1998), abordagem que fornece a estimativa da sua vida útil. Além disso, a combinação de dados sobre a história da temperatura do produto e modelos matemáticos pode levar a produtos "inteligentes", sistemas de gestão para a otimização da qualidade dos alimentos e segurança no momento do consumo (GIANNAKOUREOU et al., 2001). Os dados e os modelos podem ser armazenados em bancos de dados e utilizados para interpretar o efeito do

processamento, da distribuição e das condições de armazenamento sobre o crescimento microbiano.

Há várias classificações empregadas para estes modelos que podem ser divididas em duas classes: descritivas e explanatórias, sendo esta última composta por modelos analíticos e numéricos (MCKELLAR; LU, 2004).

Modelos descritivos (ou seja, de observações, empíricos, “black box” ou indutivos) têm dados dirigidos, sendo as aproximações, como as funções polinomiais, redes neurais artificiais e análise do componente principal, utilizadas para classificar os dados. É difícil fazer predições verdadeiras com essa classe de modelo, pois os modelos obtidos não podem ser extrapolados além dos dados utilizados para a construção do mesmo (MCKELLAR; LU, 2004). Estes modelos empíricos podem ser divididos em modelos cinéticos e probabilísticos. Os modelos cinéticos são baseados no estudo do comportamento da população microbiana em função do tempo; já os modelos probabilísticos examinam a probabilidade de que um micro-organismo responda crescendo, morrendo ou produzindo um metabólito num dado período de tempo (MCMEEKIN; ROSS, 2002).

Os modelos explanatórios (ou mecanístico, dedutivo ou “white box”) têm como objetivo relacionar os dados com os princípios científicos fundamentais ou com um processo fisiológico mensurável. Muitos modelos de microbiologia preditiva que têm seus parâmetros relatados a partir dos fenômenos observados são considerados mecanísticos. Estes modelos analíticos são explicitados em forma de equações que se ajustam aos dados experimentais. Para ser verdadeiramente mecanístico, o modelo deve levantar novas perguntas e hipóteses que possam ser testadas (MCKELLAR; LU, 2004). Sobre os modelos mecanísticos, McMeekin e Ross (2002) afirmam que estes descrevem, com base teórica, a resposta microbiana a alterações ambientais. No entanto, estes modelos são raros, devido à complexidade da fisiologia microbiana.

Uma das classificações mais utilizadas para caracterizar os modelos de microbiologia preditiva é a proposta por Whiting e Buchanan (1993), segundo a qual os modelos são divididos em primários, secundários e terciários. Os modelos primários e secundários podem ser lineares ou não lineares; segregados, quando a população é definida por células heterogêneas, ou não segregados, quando a população é definida pela população média de células; estruturado, quando é formado por vários componentes, ou não estruturado, quando é formado por um único componente (WHITING, 1995).

#### **2.5.1.1 Modelos primários**

Para López et al. (2004), o nível primário de modelos é composto por uma equação ou função utilizada para descrever a resposta microbiana ao longo do tempo, parametrizando valores. Já para Blackburn (2000), os modelos primários descrevem mudanças no número de micro-organismos ou nas respostas microbianas com o tempo, num ambiente específico.

As respostas microbianas são: duração da fase lag, velocidade específica máxima de crescimento e aumento logarítmico da população (FERREIRA, 2004). Estas podem ser expressas em termos de números de micro-organismos, ou seja, concentração de unidades formadoras de colônias, ou, ainda, pela densidade óptica, como método indireto de quantificação (SILVA, 2006).

Segundo FERREIRA (2004), uma equação, ou função matemática, descreve a mudança da resposta com o tempo, fornecendo um grupo característico de valores de parâmetros. Ou seja, por meio desses modelos primários podem-se obter valores da taxa de crescimento de determinada população e estimar o tempo de adaptação e, ainda, a população máxima (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003).

Seguem alguns exemplos de modelos primários.

#### 2.5.1.1.1 Modelo de Gompertz

O modelo de Gompertz tem sido utilizado com sucesso para descrever o comportamento microbiano em diferentes alimentos (MASSON et al., 2002). Este modelo foi introduzido na microbiologia de alimentos por Gibson e colaboradores, em 1987 (Gibson et al., 1987), os quais compararam a equação logística e a de Gompertz na parametrização de uma curva de crescimento de *Clostridium botulinum*.

É um modelo não linear. A base deste modelo é que, devido à limitação no espaço e/ou nutrientes, bem como à produção de metabólitos tóxicos, a velocidade de crescimento microbiano não é constante. Tipicamente, a velocidade de crescimento aumentaria até um máximo e depois, então, diminuiria (SARMENTO, 2006).

O ajuste do Modelo de Gompertz é fortemente afetado pelo número de observações utilizados na construção da curva, como foi observado por Bratchell et al. (1989), bem como pela qualidade estatística destas observações (FERREIRA, 2004). Além disso, é importante ressaltar que a equação de Gompertz não considera a fase lag, mas apenas o aumento da densidade de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000).

O Modelo de Gompertz (ERKMEN; ALBEN, 2002) está representado na equação 1.

$$N_t = C * \exp \{ \exp [-B (t - M)] \} \quad (1)$$

Em que  $N_t$  é a densidade da população num dado tempo  $t$  (h);  $t$  é o tempo;  $C$  é o valor da assíntota superior; o mesmo que a densidade máxima da população;  $M$  é o tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima e  $B$  é a velocidade de crescimento relativa no tempo  $M$ . Os parâmetros  $M$ ,  $B$ , e  $C$  são estimados pelo modelo.

#### **2.5.1.1.2 Modelo de Gompertz modificado**

A função ou modelo de Gompertz foi modificada por Zwietering et al. (1990). A reparametrização do modelo foi feita para que os parâmetros estimados pudessem ter significado biológico. Os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), duração da fase lag ( $\lambda$ ) e aumento logarítmico da população ( $A$ ) foram, então, introduzidos no modelo. Isso facilitou o encontro de valores iniciais e o cálculo de intervalos de confiança, durante o ajuste da curva (LABUZA; FU, 1993). Com esta reparametrização, o modelo adquiriu a forma de função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmoide assimétrica (SARMENTO, 2006).

Segundo López et al. (2004), o modelo de Gompertz modificado tem sido utilizado extensivamente, pois se acredita que suas equações descrevem suficientemente os dados de crescimento microbiano, além de serem de fácil utilização. Entretanto, em muitos estudos concluiu-se que o modelo de Gompertz modificado demonstra desvios sistemáticos no ajuste de dados de crescimento microbiano.

Sobre esses desvios, Buchanan; Whiting; Damert, (1997) relatam que, como a fase lag não é paralela ao eixo das abscissas, a equação não é uma reta e, portanto, não apresenta período de aumento linear durante a fase de crescimento exponencial, como é observado na maioria das curvas de crescimento. Assim sendo, como a velocidade de crescimento exponencial é determinada por um

ponto de inflexão na curva, o processo de ajuste tende a fornecer valores que variam mais do que as velocidades de crescimento correspondentes, determinadas por um período de crescimento linear.

Porém, mesmo com essas deficiências, o modelo modificado de Gompertz é estatisticamente suficientemente para descrever dados de crescimento e também o mais simples de se usar (IMPE et al., 1995).

O modelo modificado de Gompertz encontra-se representado na equação 2 e na Figura 2.

$$\text{Log } N_{(t)} = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (2)$$

Em que  $N_{(t)}$  é a densidade da população no tempo  $t$ ;  $A$  é o valor da assíntota inferior (equivalente ao log do número inicial de bactérias);  $C$  é o valor da assíntota superior (equivalente ao log da densidade máxima da população durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial);  $M$  é o tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima e  $B$  é a velocidade de crescimento relativa no tempo  $M$ . Esses quatro parâmetros,  $A$ ,  $C$ ,  $B$  e  $M$ , podem prontamente ser relacionados matematicamente às características culturais familiares aos microbiologistas (BUCHANAN, 1993). Como pode ser visto nas equações 3, 4, 5 e 6

$$\mu = BC/e \quad (3)$$

$$GT = [\log(2)] [e/BC] \quad (4)$$

$$\lambda = M - (1/B) \quad (5)$$

$$MPD = A + C \quad (6)$$

em que  $\mu$  é a velocidade de crescimento exponencial  $\{[\log(\text{UFC/g})]/h\}$ ; GT é o tempo de geração (h),  $\lambda$  é a duração da fase lag (h) e MPD = log da densidade máxima da população  $[\log(\text{UFC/g})]$ .

A representação de um ajuste pelo modelo de Gompertz modificado pode ser observada na Figura 2.

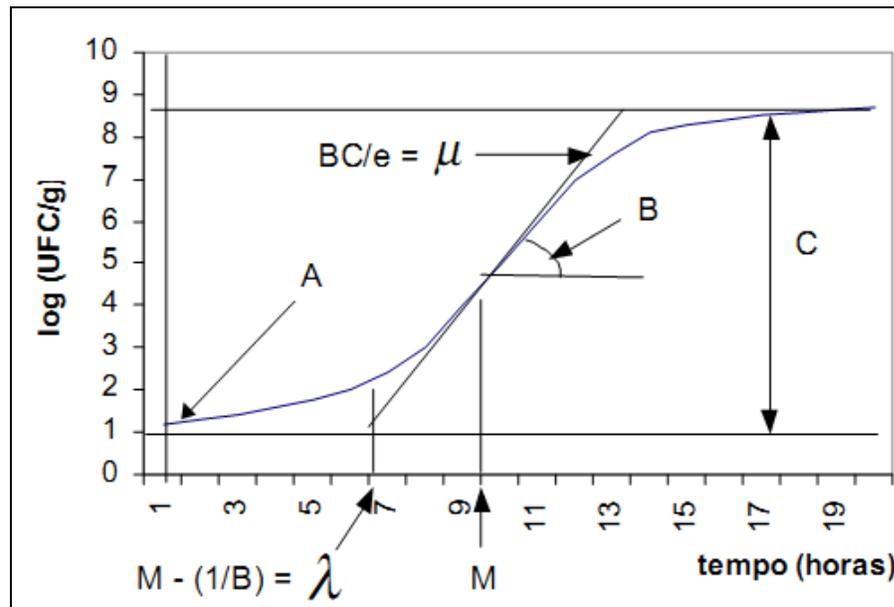


Figura 2 Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada

### 2.5.1.1.3 Modelo de Baranyi e Roberts

Para solucionar os problemas encontrados no modelo de Gompertz modificado e fornecer base mais mecanística e biológica, Baranyi e Roberts (1994) propuseram um modelo que incluiu fase de crescimento exponencial linear (x) e “fase lag” determinada por uma função de ajuste  $\alpha(x)$  (PEÑA, 2005).

O modelo de Baranyi e Roberts supõe que, após certo período de ajuste da população, a taxa de crescimento se torna constante e uma assíntota superior

pode ser acomodada, descrevendo uma fase linear de crescimento, ou seja, a fase exponencial do crescimento pode ser representada como uma reta (GIBSON et al., 1994). Uma representação deste modelo se encontra na Figura 3.

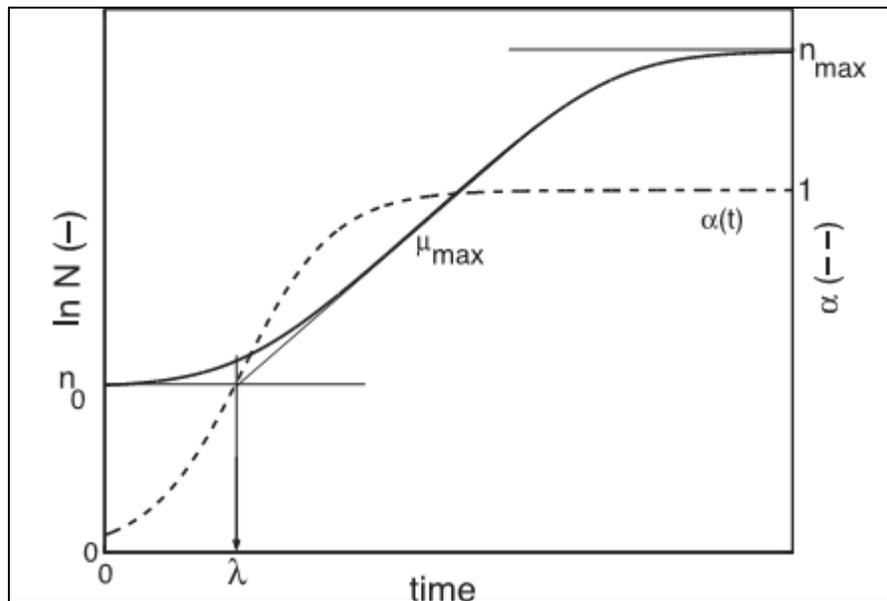


Figura 3 Simulação do modelo de Baranyi e Roberts (1994)

O modelo de Baranyi e Roberts apresentado na equação 7 é comumente aceito como um modelo de crescimento determinístico.

$$dN/dt = [Q(t) / (1 + Q(t))] \cdot \mu_{\max} \cdot [1 - N(t)/N_{\max}] \cdot N(t) \quad (7)$$

$$dQ/dt = \mu_{\max} \cdot Qt \quad (8)$$

em que  $N$  é a densidade celular (UFC/mL);  $\mu_{\max}$  é a taxa de crescimento específico máxima (1/h);  $N_{\max}$  é a densidade celular máxima (UFC/mL) e  $Q$  é a

medida do estado fisiológico das células. A parte  $[Q(t) / 1 + Q(t)]$  representa o ajuste da função  $\alpha(t)$  como um fator extra para descrever a fase lag. Esta função permite a transição da fase lag para a fase de crescimento exponencial, por descrever a diminuição gradual do efeito do ambiente embutido em  $Q(0)$ , que representa o estágio fisiológico inicial das células no momento da inoculação (SWINNEN et al., 2004).

Portanto,

$$\alpha(t) = Q(t) / (1 + Q(t)) \quad (9)$$

Outra transformação,

$$h(t) = \ln [1 + (1/Q(t))] = -\ln \alpha(t) \quad (10)$$

É mais usual, do ponto de vista computacional, podendo ser considerada uma transformação estatística estável de  $Q(t)$  e  $\alpha(t)$ . O valor  $h_0 = h(0) = -\ln \alpha(0)$  será o produto da taxa específica de crescimento máximo e de lag (BARANYI; ROBERTS, 1994), valores esses obtidos com a modelagem primária, ficando, assim, a interpretação matemática desse estado fisiológico das células mais compreensível.

Em conclusão, esta função considera características do meio e do micro-organismo em questão, critério importante devido às influências dos diferentes fatores ou variáveis que provocam mudanças no meio e no metabolismo do micro-organismo, analisando o seu comportamento de forma mais completa que a equação de Gompertz (PEÑA, 2005). Impe (2005) considera também como motivos para a vasta utilização deste modelo algumas razões, como ser fácil de usar, é aplicável sob condições ambientais dinâmicas, tem boa capacidade de ajuste e a maioria dos parâmetros é biologicamente interpretável.

### **2.5.1.2 Modelos secundários**

Variações na população de micro-organismos nos alimentos, com o tempo (cinética microbiológica), são orientadas pelas condições de estocagem (fatores extrínsecos) e pelas características do produto (fatores intrínsecos). Estes fatores, coletivamente, são denominados parâmetros ambientais (SARMENTO, 2006). Para Nakashima, André e Franco (2000), o nível secundário da modelagem envolve equações que descrevem como as respostas dos modelos primários (duração da fase de adaptação, velocidade de crescimento e densidade máxima da população) mudam com alterações desses fatores ambientais, que podem ser pH, temperatura, atividade de água (aw) e concentração de agentes antimicrobianos, entre outros (SCHAFFNER; LABUZA, 1997).

De acordo com Mcmeekin e Ross (2002), na modelagem secundária tem que ser considerado o efeito individual de cada fator, mas, em diferentes situações, é necessário considerar como os diferentes fatores interagem, restringindo o crescimento microbiano.

#### **2.5.1.2.1 Modelo de Arrhenius**

Este modelo é comumente aplicado para verificar o efeito da temperatura sobre o crescimento microbiano. Labuza e Fu (1993) demonstraram que a lei de Arrhenius se aplica para uma determinada faixa de temperatura, uma vez que o crescimento microbiano é um processo bioquímico. Desse modo, a influência da temperatura na velocidade específica de crescimento pode ser caracterizada pela energia de ativação, uma vez que todos os outros fatores são mantidos constantes.

A equação 9 representa o modelo de Arrhenius, em que pode ser observada a energia de ativação citada acima.

$$\ln(B) = \ln(F) - (Ea/RT) \quad (11)$$

em que B é a taxa de crescimento relativa no tempo M ( $h^{-1}$ ); F é o fator pré-exponencial ( $h^{-1}$ ); Ea é a energia de ativação para o crescimento da bactéria (Kj/mol); R é a constante dos gases (8.314 J/mol.K) e T é a temperatura absoluta (K).

Segundo SILVA (2006), a equação de Arrhenius assume que a velocidade de crescimento é controlada pela velocidade limite de uma única reação enzimática.

#### 2.5.1.2.2 Modelo da raiz quadrada

Modelo da raiz quadrada é baseado na relação linear entre a raiz quadrada da velocidade específica máxima de crescimento e a temperatura. Este modelo foi inicialmente utilizado por Ratkowsky et al. (1983), para descrever o efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento (SLONGO, 2008). Para este modelo, é assumido que os fatores ambientais são independentes, ou seja, que não existe interação entre eles (SILVA, 2006).

Este modelo, também conhecido como Modelo de Belehradek, descreve, assim como o modelo de Arrhenius, o efeito da temperatura na taxa de crescimento bacteriano e é expresso pela equação 12.

$$\sqrt{K} = b (T - T_{min}) \quad (12)$$

em que  $k$  é a taxa de crescimento;  $T$  é a temperatura;  $T_{min}$  é a temperatura abaixo da qual não há crescimento e  $b$  é o parâmetro a ser estimado (PEÑA, 2005).

Segundo Alvarenga (2008), os modelos do tipo raiz quadrada têm modelo de estrutura que incorpora, a priori, o conhecimento microbiológico, enquanto os valores dos parâmetros são identificados no conjunto de dados na mão, tendo a possibilidade de extrair bons valores a partir de literatura.

#### **2.5.1.2.3 Modelo de superfície de resposta**

A metodologia de superfície de resposta é uma equação de regressão que se ajusta utilizando-se técnicas padrões de regressão e podem conter termos lineares, quadráticos e cúbicos, dentre outros (WHITING, 1995)

O uso desse tipo de modelo é muito comum na análise de efeitos das variáveis independentes sobre a resposta microbiana, mas, de acordo com Lou e Nakai (2001), podem ter inconvenientes, já que, geralmente, o crescimento não é linear. Assim, pode ser difícil sua aplicação em casos não lineares (PEÑA, 2005).

#### **2.5.1.3 Modelos terciários**

Segundo Whiting (1995), os modelos terciários são ferramentas em que as rotinas dos softwares computacionais transformam os modelos primários e secundários em programas amigáveis, como softwares e sistemas espertos. Estes programas podem calcular as respostas microbianas de acordo com as mudanças nas condições ambientais, comparar efeito de diferentes condições ou comparar o comportamento de diversos micro-organismos. No entanto, o

sucesso do uso de modelos pela indústria para aplicações específicas depende do desenvolvimento de tecnologias apropriadas para a sua aplicação (MCMEEKIN; ROOS, 2002).

Como exemplos destes programas podem ser citados Combase, SSP (Sea Food Spoilage Predictor), Food Micromodel (FMM), Pathogen Microbial Model (PMP) e Growth Predictor & Perfringens Predictor (SILVA, 2006).

#### **2.5.1.3.1 ComBase**

O ComBase é uma vasta base de dados de respostas microbianas aos ambientes alimentares que tem chamado muito a atenção dos pesquisadores e processadores de alimentos (KOSEKI, 2009).

Na base de dados, o pacote conta com 24.000 gravações de curvas de crescimento e sobrevivência de micro-organismos, que abrangem os deteriorantes, taxas de crescimento/morte e os patogênicos. Alguns exemplos de micro-organismos que podem ser citados são *Bacillus cereus* (esporos e células vegetativas), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *innocua*, *Staphylococcus aureus*, etc., além da microbiota contaminante de bactérias psicotróficas em carnes (BARANYI, 2006).

#### **2.5.1.3.2 DMFit**

Este programa é uma extensão do Excel para ajustar curvas de crescimento em que a fase linear (log) é precedida e seguida por fases estacionárias. DMFit é baseado no trabalho de Baranyi & Roberts intitulado “A dynamic approach to predicting bacterial growth in food”, publicado em 1994, na revista *International Journal of Food Microbiology*.

DMFit é parte do sistema utilizado internamente no Institute of Food Research para modelar a variação do logaritmo das concentrações de células de culturas bacterianas em relação ao tempo. Tem sido a principal ferramenta no desenvolvimento de modelos que constam no sistema COMBASE.

#### **2.5.1.3.3 Sea Food Spoilage Predictor (SSP)**

Desenvolvido pelo Ministério da Pescaria da Dinamarca, o software facilita o uso prático de modelos matemáticos e pode prever o efeito de temperaturas constantes e variáveis sobre a taxa relativa de contaminação do alimento (DALGAARD, 1995). Foi desenvolvido para prever a vida de prateleira de alimentos de origem marinha (FERREIRA, 2004).

#### **2.5.1.3.4 Food Micromodel (FMM)**

Este software foi desenvolvido por um grupo de empresas em conjunto com o governo do Reino Unido (FERREIRA, 2004) e implementado pelo Ministério de Agricultura da Inglaterra. O Food Micromodel é um software consistente de modelos matemáticos que permitem ao usuário prever o crescimento, a sobrevivência e a inativação térmica de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, usando o computador pessoal (BLACKBURN, 2000).

Os modelos no Food Micromodel foram produzidos por meio de dados obtidos em meios de crescimento em laboratório e validados pela comparação de previsões feitas pelo modelo com dados obtidos da literatura ou de estudos com alimentos inoculados (STRINGER; DENNIS, 2000). As curvas de crescimento foram desenvolvidas em meios líquidos homogêneos, para que o crescimento dos micro-organismos ocorresse mais rapidamente que o observado em

alimentos e, assim, o programa poderia gerar predições seguras (GIFFEL; ZWIETERING, 1999).

#### **2.5.1.3.5 Pathogen Microbial Model (PMP)**

Este programa foi desenvolvido, nos Estados Unidos, pelos pesquisadores Dr. Robert L. Buchanan e por Dr. Richard Whiting. O PMP prevê curvas de crescimento de bactérias a valores definidos de temperatura, pH e concentração de NaCl (ou atividade de água). O software PMP lança mão de parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz por reparametrização para gerar as superfícies de resposta (BUCHANAN et al. 1989).

As vantagens deste programa são o fato de não ter custo e ser fácil de usar. As desvantagens são que o usuário pode fornecer apenas predições individuais dos parâmetros de Gompertz e estes não podem ser coletados em uma tabela, para determinados valores de fatores ambientais (FERREIRA, 2004).

O programa é composto por modelos de crescimento para *Aeromonas hydrophila*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella flexneri*, *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica*. Todos esses modelos predizem o incremento da população microbiana em função do tempo (BUCHANAN et al., 1990).

#### **2.5.1.3.6 Pseudomonas Predictor**

Desenvolvido pela Universidade de Tasmânia, o software baseia-se no modelo de crescimento de *Pseudomonas* e pode ser aplicado para alimentos estocados em diferentes atmosferas, podendo ser avaliados os perfis de temperatura (NEUMEYER; ROSS; McMEEKIN, 1997).

#### **2.5.1.3.7 Food Spoilage Predictor**

Desenvolvido por Neumeier, Ross e McMeekin, (1997), é um software comercial que modela o efeito da atividade de água e de flutuações de temperatura no crescimento de pseudomonas psicrotolerantes (FERREIRA, 2004).

#### **2.5.2 Modelos de predição aplicados em carne e em produtos cárneos**

Seguem exemplos da aplicação dos modelos preditivos aplicados em carnes e produtos cárneos, os quais podem ser vistos em trabalhos realizados nos últimos cinco anos, no país e fora dele.

Mataragas et al. (2006), estudando a deterioração em produtos cárneos curados e cozidos, constataram que o modelo de Gompertz descreveu melhor os dados experimentais do que o modelo logístico modificado e o modelo de Baranyi e Roberts. E, para modelar os parâmetros cinéticos de crescimento, usaram os modelos da raiz quadrada e de Arrhenius, sendo este último de melhor desempenho.

No mesmo ano, Koutsoumanis et al. (2006) também utilizaram os modelos matemáticos de predizer a deterioração por *Pseudomonas* spp, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* e pelas bactérias do ácido láctico em carne moída bovina e suína, sob variação da temperatura e do pH. Para isso utilizaram o modelo de Baranyi e Roberts para a estimativa dos parâmetros de crescimento e um modelo modificado de Arrhenius para modelar o efeito do pH e das temperaturas de armazenamento sobre os parâmetros cinéticos.

No ano de 2008, Gospavic et al. (2008) desenvolveram estudo para predizer o crescimento de *Pseudomonas* spp. em carne de ave, utilizando os

modelos primários de Gompertz modificado e de Baranyi e Roberts e o modelo secundário da raiz quadrada, para avaliar o efeito da temperatura sobre a taxa específica máxima de crescimento nos modelos primários usados.

Kreyenschmidt et al. (2009) testaram e analisaram diferentes modelos primários e secundários para encontrar a melhor maneira de calcular a vida útil de presunto cozido e fatiado. Para a modelagem primária, compararam o modelo de Gompertz e o modelo logístico modificado, não encontrando diferenças substanciais entre eles. Para a modelagem do efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento, utilizaram o modelo de Arrhenius e o modelo da raiz quadrada, tendo o primeiro apresentado melhores resultados. Esses mesmo autores ainda observaram que a combinação que apresentou melhores resultados preditivos foi a do modelo logístico modificado juntamente com a equação de Arrhenius.

Mais recentemente, Bruckner et al. (2013) desenvolveram um modelo de predição para *Pseudomonas* spp. em carne fresca de porco e de aves, utilizando o modelo primário de Gompertz e o modelo secundário de Arrhenius, obtendo boas predições de ambos os modelos.

A respeito dos trabalhos nacionais que fazem usos de modelos matemáticos em produtos cárneos, tem-se a tese de Ferreira (2004), que avaliou a vida útil de presunto fatiado submetido a três temperaturas de estocagem. Neste trabalho, os modelos de Gompertz, Gompertz modificado e logístico foram ajustados ao crescimento das bactérias ácido lácticas, tendo o modelo de Gompertz modificado sido o que melhor descreveu o crescimento. Foram comparados também os modelos secundários modelo da raiz quadrada, linear e de Arrhenius para avaliar o efeito da temperatura de armazenamento na velocidade específica máxima de crescimento e na duração da fase lag. Estes três modelos apresentaram desempenhos satisfatórios tendo o modelo da raiz quadrada sido o que proporcionou melhores resultados, em geral.

Outro trabalho nacional nesta área é o de Slongo (2008), que ajustou os dados de crescimento de bactérias do ácido láctico em presunto fatiado submetido à alta pressão hidrostática, aos modelos primários de Gompertz modificado e logístico. Pela análise dos índices matemáticos, o modelo de Gompertz modificado foi o que apresentou melhores resultados de predição. Este mesmo autor avaliou também o desempenho de predição dos modelos secundários modelo linear, equações empíricas e modelo da raiz quadrada, tendo todos apresentados índices estatísticos aceitáveis, porém, o modelo da raiz quadrada apresentou ajustes um pouco inferiores, quando comparados aos outros modelos.

## REFERÊNCIAS

AL-JASSER, M. S. Effect of cooling and freezing temperatures on microbial and chemical properties of chicken meat during storage. **Journal of Food Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 10, n. 1, p. 113-116, Jan. 2012.

ALVARENGA, V. O. **Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana-de-açúcar**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2008. Disponível em: <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=589](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=589)>. Acesso em: 10 nov. 2012.

ABIEC- Associação Brasileira Das Indústrias Exportadoras De Carne, 2012. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/estatisticas/>. Acesso em: 23 out. 2012.

AXE, D. D.; BAILEY, J. E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 47, n. 1, p. 8-19, July 1995.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 4, p. 668–673, Apr. 2003.

BAKA, M. et al. Impact of pH on the cardinal temperatures of *E. coli* K12: evaluation of the gamma hypothesis. **Food Control**, Guildford, v. 29, n. 2, p. 328-335, Feb. 2013.

BANWART, G. J. **Basic food microbiology**. 2<sup>nd</sup> New York: Reinhold van Nostrand, 1989.

BARANYI, J. **The ComBase project to pool food microbiology data and expertise**. Norwich: Institute of Food Research, 2006. 9 p.

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

BARCELLOS, M. D. et al. European consumers' acceptance of beef processing technologies: A focus group study. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 721-732, Oct. 2010.

BEAUFORT, A. et al. The effects of superchilled storage at -2 degrees C on the microbiological and organoleptic properties of cold-smoked salmon before retail display. **International Journal of Refrigeration: revue internationale du froid**, Surrey, v. 32, p. 1850–1857, 2009.

BECKER, A. K.; KIEL, G. Análise microbiológica de carne bovina *in natura* comercializada em supermercados de cascavel – PR. **Revista Thêma et Scientia**, Cascavel, v. 1, n. 2, p. 149-155, jul./dez. 2011.

BLACKBURN, W. C. Modeling shelf-life. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: CRC/LLC, 2000. Cap. 3.

BLIXT, Y.; BORCH, E. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. **Meat Science**, Barking, v. 60, n. 4, p. 371–378, Apr. 2002.

BODDY, L.; WIMPENNY, J. W. T. Ecological concepts in food microbiology. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, n. 21S, p. 23S–38S, Dec. 1992.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 103-120, Nov. 1996.

BRATCHELL, N. et al. Predicting microbial growth: the consequences of quality data. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 47-58, Feb. 1989.

BRUCKNER, S. et al. A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. **Food Control**, Guildford, v. 29, n. 2, p. 451-460, Feb. 2013.

BUCHANAN , R.L.; STAHL, H.G.; WHITING, R.C. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. v. 52, n.12, p.844-85. 1989.

BUCHANAN, R. L.; PHILLIPS, J. G. Response surface model for predicting the effect of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*, **Journal Food Protection**, n.53, p.370-376, 1990.

BUCHANAN, R. L. Developing and distributing user friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 3-5, p. 251-255, Feb. 1993.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, London, v. 14, n. 4, p. 313-326, Aug. 1997.

CARDENAS, F. C.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 509-520, July 2008.

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, p. 103S-114S, 1992.

DALGAARD, P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 319-333, Aug. 1995.

DELHALLE, L. et al. A review of growth models in predictive microbiology to ensure food safety. **Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement**, Siraitodai, v. 16, n. 3, p. 369-381, 2012.

DELIGNETTE-MULLER, M. L. et al. Use of Bayesian modelling in risk assessment: application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 195-208, Feb. 2006.

ERCOLINI, D. et al. Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4663-4671, July 2006.

ERCOLINI, D. et al. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 1990-2001, Apr. 2009.

ERKMEN, O.; ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 52, n. 2, p. 161-166, 2002.

ESMER, O. K. et al. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. **Meat Science**, Barking, v. 88, n. 2, p. 221-226, June 2011.

FAUSTMANN, C.; CASSENS, R. G. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. **Journal of Muscle Foods**, v. 1, n. 3, p. 217-243, 1990.

FERGUSON, D. M.; WARNER, R. D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, Barking, v. 80, p. 12–19, 2008.

FERRÃO, S. P. B. et al. Características sensoriais da carne de cordeiros da raça Santa Inês submetidos a diferentes dietas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 185-190, jan./fev. 2009.

FERREIRA, L. D. **Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

FERRER, J. et al. Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 2-8, Aug. 2009.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 101–117, Sept. 1999.

FONSECA, T. P. **Boas práticas de armazenamento e distribuição da central de distribuição frigorificada de uma rede de supermercados do Distrito Federal**. 2004. 61 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos)-Universidade de Brasília, Brasília: 2004.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p., 1996.

FRITZEN et al. Análise microbiológica de carne moída de açougues pertencentes a 9ª Regional de Saúde do Paraná. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 144, set. 2006.

FROTA, G. L. de S. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias da carne bovina “in natura” abatida no Matadouro Público do Município de**

**Sertânia – PE.** 2009. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.

GARCIA, T. et al. Review - shelf-life extension of fresh meat .2. washing and irradiation procedures. **Revista Espanola de Ciencia y Tecnologia de Alimentos**, v. 35, n. 2, p. 121-138, Apr. 1995.

GIANNAKOUROU, M. et al. Development and assessment of an intelligent shelf life decision system (SLDS) for quality optimization of the food chill chain. **Journal Food Protection**, Dês Moines, v. 64, n. 7, p. 1051–1057, July 2001.

GIANNUZZI, E.; ZARITZKY, L. E. N. Efeito do ácido ascórbico em comparação ao ácido cítrico e láctico na inibição de *Listeria monocytogenes* em temperaturas de refrigeração. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 29, p. 1-8, 1996.

GIBSON, A. et al. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 3-4, p. 419-431, Nov. 1994.

GIFFEL, M. C.; ZWIETERING, M. H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 135–149, Nov. 1999.

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C.; BRYANT, J. M. Microbial contamination of meat during the skinning of beef carcass hindquarters at three slaughtering plants. . **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 175-184, July 1998.

GILL, C. O.; NEWTON. K. G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**, Barking, v. 2, n. 3, p. 207-217, July 1978.

GORRIS, L. G. M. Food safety objective: na integral part of food chain management. **Food Control**, Guildford, v. 16, n. 9, p. 801–809, Nov. 2005.

GOSPAVIC, R. et al. Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 290-297, Oct. 2008.

GRAM, L. et al. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1-2, p. 79-97, Sept. 2002.

HEDRICK, H. B. et al. **Principles of meat science**. Dubuque: Kendall, 1993.

HERNANDEZ-MACEDO, M.; BARANCELLI, G. V.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-11, Jan./Mar. 2011.

HOCQUETTE, J. F. et al. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat Science**, Barking, v. 92, p. 197-209, 2012.

IMPE, J. F. van et al. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 227-249, May 1995.

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

INGHAM, S. C. et al. Predicting behavior of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Serovars, and *Escherichia coli* O157:H7 in pork products during single and repeated temperature abuse periods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 10, p. 2114-2124, Oct. 2009.

ISABELLE, L.; ANDRE, L. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**: revue internationale du froid, Surrey, v. 29, n. 6, p. 968-984, Sept. 2006.

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive microbiology: a review. **Biocontrol Science**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2003.

JASTRZEBSKA, A. A comparative study for determination of biogenic amines in meat samples by capillary isotachopheresis with two electrolyte systems. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 235, n. 3, p. 563-572, Sept. 2012.

JAY, J. M. I. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711 p.

KAALE, L. D. et al. Superchilling of food: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 107, n. 2, p. 141-146, Dec. 2011.

KIM, S. A. et al. Food safety perceptions and practices of housewives in Korea. In: ANNUAL MEETING OF KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 78., 2011, Daegu. **Poster Presentation...** Daegu: Society of Food Science and Technology, 2011. p. 10, 114

KIM, S. A. et al. Temperature increase of foods in car trunk and the potential hazard for microbial growth. **Food Control**, Guildford, v. 29, n. 1, p. 66-70, Jan. 2013.

KISKA, D.L.; GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 517-525.

KOSEKI, S. Microbial responses viewer (MRV): aA new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 75-82, Aug. 2009.

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

KOUTSOUMANIS, K. et al. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 124-134, Jan. 2006.

KREYENSCHMIDT, J. et al. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 510-520, Feb. 2009.

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, Barking, v. 52, n. 3, p. 299-305, July 1999.

LABUZA, T. P.; FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: teory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 3-5, p. 309-323, 1993.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat – a review. **Food Microbiology**, London, v. 8, n. 4, p. 267–297, Dec. 1991.

LANDIM, A. V. et al. Physical, chemical and sensorial parameters for lambs of different groups, slaughtered at different weights. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 43, n. 6, p. 1089-1096, Aug. 2011.

LEBERT, I.; BEGOT, C.; LEBERT, A. Growth of pseudomonas fluorescens and pseudomonas fragi in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water

activity (0.97–1.00) and temperature (7 25 °C). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n. 39, n. 1-2, p. 53–63, Jan. 1998.

LIU, F.; YANG, R. Q.; LI, Y. F. Correlations between growth parameters of spoilage micro-organisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10 degrees C. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 6, p. 578-583, Sept. 2006.

LÓPEZ, S. et al. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 289-300, Nov. 2004.

LOU, W.; NAKAI S. Application of artificial neural networks for predicting the thermal inactivation of bacteria: a combined effect of temperature, pH and water activity. **Food Research International**, v. 34, n. 7, p. 573-579, 2001.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de carne bovina no Brasil: qualidade, quantidade ou ambas? In: SIMPÓSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE, 2., 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: Faculdades Integradas da UPIS, 2006.

LUNDGREN, P. U. et al. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa/PB-Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 1, p. 113-119, jan./mar. 2009.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MANO, S. B.; ORDONEZ, J. A.; GARCIA de FERNANDO, G. D. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 657–669, Dec. 2000.

MARKS, B. P. Status of microbial modeling in food process models. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n. 1, p. 137–143, Jan. 2008.

MASON, I. G. Mathematical modeling of the composting process: a review. **Waste Management**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 3-21, 2006.

MASSON, Y. et al. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 2, p. 125-131, Sept. 2002.

MATARAGAS, M. et al. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 6, p. M157-M167, Aug. 2006.

MAYR, D. et al. Rapid detection of meat spoilage by measuring volatile organic compounds by using proton transfer reaction mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4697-4705, Aug. 2003.

MCAFEE, A. J. et al. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 1, p. 1–13, Jan. 2010.

McDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n. 1-2, p. 1–27, Nov. 1999.

MCKELLAR, R.; LU, X. **Modeling microbial responses on foods**. Boca Raton: CRC, 2004.

MCMEEKIN, T. A. et al. Information systems in food safety management. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 181–194, Dec. 2006.

MCMEEKIN, T. A. et al. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 2-3, p. 395-407, Mar. 2002.

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1-2, p. 133-153, Sept. 2002.

MEMBRE, J. M.; LAMBERT, R. J. W. Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 10-15, Nov. 2008.

MORKBAK, M. R.; NORDSTRÖM, J. The impact of information on consumer preferences for different animal food production methods. **Zeitschrift für Verbraucherpolitik: journal of consumer policy**, Newied, v. 32, n. 4, p. 313-331, Dec. 2011.

NAILA, A. et al. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 7, p. R139-R150, Sept. 2010.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: aspectos básicos da microbiologia preditiva. **Brasilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 33, p. 41-51, 2000.

NEUMEYER, K.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. Development of pseudomonas predictor, **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 52, p. 120-122, 1997.

NYCHAS, G. E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, Jan. 2008.

NYCHAS, G.-J. E.; MARSHALL, D. L.; SOFOS, J. Meat, poultry and seafood. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food**

**microbiology: fundamentals and frontiers.** 3<sup>rd</sup> ed. Washington: ASM, 2007. p. 105-140.

OLAOYE, O. A. Meat: an overview of its composition, biochemical changes and associated microbial agents. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 3, p. 877-885, 2011.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2. (Alimentos de origem animal),

PALLERONI, N. J. Pseudomonadaceae. In: KREIG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic biology.** Baltimore: The Williams and Wilkins, 1984. p. 141-199.

PEÑA, W. E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005

PENG, Y. et al. et al. Potential prediction of the microbial spoilage of beef using spatially resolved hyperspectral scattering profiles. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 102, n. 2, p. 163–169, Jan. 2011.

PENNACHIA, C.; ERCOLINI, C.; VILLANI, F. Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 230–236, Sept. 2009.

PENSEL, L. The future of red meat in human diets. **Nutrition Abstracts and Reviews: serie A**, Oxford, v. 68, p. 1-4, 1998.

PETER, H. A.; SNEATH, A.; JONES, D. Brochotrix. In: \_\_\_\_\_. ( Ed.). **Bergey's manual of systematyc bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1249-1253.

PIERSON, M.; CORLETT JR, D. A. **HACCP: principles and applications**. New York: Chapman & Hall, 1992. 212 p.

POUILLOT, R.; LUBRAN, M. B. Predictive microbiology models vs. modeling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: what parameters matter and why. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 4, p. 720-726, June 2011.

PSOMAS, A. N. et al. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 76, n. 1, p. 119-129, Mar. 2011.

RATKOWSKY, D. A. et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 154, p. 1222-1226, 1983.

ROÇA, R. O. **Microbiologia da carne**. Botucatu: UNESP, 2004. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5217/material\\_didatico/microbiologia\\_da\\_carne.pdf](http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5217/material_didatico/microbiologia_da_carne.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2012.

RUIZ-CAPILLAS, C.; PINTADO. T.; JIMENEZ-COLMENERO, F. Biogenic amine formation in refrigerated fresh sausage “chorizo” keeps in modified atmosphere. **Journal of Food Biochemical**, v. 36, p. 449-457, 2012.

RUSSO, F. et al. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 8, p. 797-802, Dec. 2006.

SALLAM, K. I.; SAMEJIMA, K. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 865-871, 2004.

SARMENTO, C. M. P. **Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida de prateleira da mortadela e da linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico.** 2006. 145 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL. **Elementos de apoio para o sistema APPCC.** Brasília, 1999. 371 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar).

SILVA, A. R. **Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente a pH e temperatura.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SILVA, J. A. **Extensão da vida de prateleira da carne bovina pela utilização de sanitizantes físicos e químicos.** 1995. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1995.

SLONGO, A. P. **Uso de alta pressão hidrostática em presunto: avaliação físico-química e sensorial e modelagem do crescimento microbiano** 2008. 124 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

STELLING, J. Mathematical models in microbial systems biology. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 513-518, Oct. 2004.

STRINGER, M.; DENIS, C. **Chilled foods**: a comprehensive guide. 2. ed. Cambridge: Woodhead, 2000. 486 p.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 137–159, 2004.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unissinos, 2005. 216 p.

TIENUNGOON, S. et al. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4979-4987, Nov. 2000.

União Nacional da Indústria e Empresas de Carne, UNIEC, 2012. Disponível em: < <http://uniecbrasil.com/>> Acesso em: 15 dec., 2012.

VINCI, G.; ANTONELLI, M. L. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. **Food Control**, Guildford, v. 13, p. 519–524, 2002

WHITING, R. C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 467-494, Nov. 1995.

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

WIJTZES, T. et al. A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n.1-2, p. 79–90, June, 1998.

XU, Y.; Z. et al. Genotypic characterization of *Brochothrix* spp. isolated from meat, poultry and fish. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 245–251, Sept. 2010.

ZAKRYS, P. I. Consumer acceptability and physicochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. **Meat Science**, Barking, v. 81, n. 4, p. 720-725, Apr. 2009.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, June 1990.

**SEGUNDA PARTE - MODELAGENS PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DO  
CRESCIMENTO DE *Pseudomonas fluorescens* EM DIFERENTES  
VALORES DE TEMPERATURAS E pH**

## RESUMO

A carne é um alimento altamente perecível, devido à disponibilidade de nutrientes, como em torno de 30% de proteínas, 9% de gorduras e vitaminas, além de apresentar alta atividade de água e pH em torno de 5,6, o que faz deste alimento meio propício para instalação e proliferação microbiana. A carne fresca, exposta ao oxigênio, está sujeita à ação de micro-organismos deteriorados. Dentre eles, um que é bastante relatado é a *Pseudomonas* spp., um aeróbio, psicrotrófico, de metabolismo proteolítico e lipolítico, cujo crescimento em alimentos é responsável pelo aparecimento de limo, sabor e odor desagradáveis. Para entender o comportamento e prever o crescimento de *P. fluorescens* em carne fresca com diferentes valores de pH iniciais e armazenada em temperaturas de refrigeração e de abuso, aplicou-se a modelagem matemática microbiana. Utilizou-se, para tal, o ajuste dos modelos primários de Baranyi e Roberts e Gompertz modificado aos dados experimentais, para a obtenção dos parâmetros de crescimento. Para análise da influência dos fatores, pH e temperatura sobre o parâmetro de crescimento  $\mu_{max}$ , utilizou-se o modelo de Ratkowsky estendido. Todos os ajustes foram feitos por meio do programa DMFit 3.0. Os dados experimentais apresentaram bom ajuste a ambos os modelos primários testados e o modelo secundário gerado a partir de dados primários de Baranyi e Roberts foi mais bem validado. Assim, estes modelos podem ser aplicados para prever o crescimento de *P. fluorescens* nas mesmas condições testadas.

Palavras-chave: Carne, Deterioração, Modelagem.

## ABSTRACT

Meat is a highly perishable food due to availability of nutrients like 30% proteins, 9% fats, vitamins, beyond the present high water activity and pH around 5.6, which makes it suitable for installation through food and microbial proliferation. Fresh meat, exposed to oxygen, is subject to the action of spoilage micro-organisms, among them one too is reported to *Pseudomonas* spp. This is an aerobic, psychrotrophic bacterial, lipolytic and proteolytic metabolism in foods whose growth is responsible for the appearance of lime, taste and unpleasant odor. To understand the behavior and predict the growth of *P. fluorescens* in fresh meat with different initial values of pH and stored at refrigeration and abuse temperatures, applied mathematical modeling microbial. It used to just fit the experimental data of the growth models of primary Baranyi and Roberts and modified Gompertz to obtain the growth parameters. To analyze the influence of factors, pH and temperature on the growth parameter  $\mu_{\max}$  used the model Ratkowsky extended, all adjustments have been made through the program DMFit 3.0. The experimental data showed good fit for both models tested primary and secondary model generated from data primary Baranyi and Roberts was better validated. Thus, these models can be applied to predict the growth of *P. fluorescens* under the same conditions tested.

Keywords: Meat, Deterioration, Modeling.

## 1 INTRODUÇÃO

A carne bovina é altamente perecível, devido ao seu elevado valor nutricional, à elevada atividade de água e ao pH favorável ao desenvolvimento microbiano.

Visando aumentar a vida útil de carne *in natura*, vários métodos de conservação podem ser utilizados, dentre eles a refrigeração, que é um dos mais frequentemente utilizados (ERCOLINI et al., 2009). A refrigeração conserva os alimentos, pois, a baixas temperaturas, os micro-organismos têm suas taxas metabólicas reduzidas (LEBERT; BEGOT; LEBERT, 1998), devido ao fato de elas serem controladas por enzimas que são extremamente dependentes da temperatura para atuação ótima. Portanto, é de extrema importância controlar e manter essa temperatura de refrigeração de alimentos cárneos dentro dos limites aceitáveis para garantir a segurança, a integridade e estender a vida útil desses produtos (ZHOU et al., 2009).

Porém, mesmo sob refrigeração, pode haver o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos (GILL; NEWTON, 1978), os quais desenvolveram mecanismos fisiológicos, pelos quais, a baixas temperaturas, aumentam o grau de insaturação de ácidos graxos da membrana, obtendo, assim, redução do ponto de fusão de fosfolipídios e lipídios, permitindo manutenção da atividade da membrana plasmática, pelo fato de ela se manter em estado semifluido (JAY, 2005).

Dentre os micro-organismos psicotróficos que podem se desenvolver em carnes refrigeradas, comprometendo sua qualidade e vida útil, destaca-se *Pseudomonas* spp (COATES et al., 1995; WIDDERS et al., 1995), que são micro-organismos gram-negativos, aeróbios, proteolíticos e lipolíticos vastamente relacionados com a deterioração de carnes frescas. Grande parte das

pseudomonas encontradas em carnes é de *P. fluorescens*, caracterizadas por produzirem pigmento solúvel denominado de pioverdina.

Para avaliar a qualidade de alimentos susceptíveis à deterioração por esses micro-organismos deterioradores, como as *P. fluorescens*, pode-se lançar mão do uso da microbiologia preditiva, a qual, por meio de modelos matemáticos, prediz a resposta microbiana a determinadas condições ambientais. Com isso, pode-se inferir sobre a qualidade e vida útil da carne em condições similares às previstas no modelo (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000).

Este trabalho foi realizado com objetivo de modelar e validar modelos matemáticos que descrevam o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas e pH.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local e condução do experimento**

A obtenção das curvas de crescimento nos tempos e temperaturas testados se deu no Laboratório de Microbiologia, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

### **2.2 Micro-organismo utilizado**

Foi utilizada a bactéria liofilizada *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525.

### 2.3 Padronização e manutenção do inóculo

A cepa liofilizada foi ativada em caldo *brain heart infusion* (BHI) e incubada, a 28 °C/24 horas. Após a ativação, alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos, que foram centrifugados a 3000 x g/5 min, em microcentrífuga (Eppendorf). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e alíquotas de 1 mL de meio de congelamento (15 mL de glicerol, 0,5 g peptona bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 100 mL de água destilada) foram utilizadas para a ressuspensão das células. Após homogeneização, as culturas foram estocadas em freezer, a -18 °C.

Para a utilização das cepas, estas foram ativadas em caldo BHI e incubadas, a 28 °C/24 horas. Após ativação, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos contendo caldo BHI e incubadas, a 28 °C, até a obtenção do número de células necessárias à padronização.

Para padronização do inoculo, o crescimento da bactéria *P. fluorescens* foi acompanhado até a entrada na fase estacionária do crescimento.

Para isso, 0,1 mL do inóculo ativado foi transferido para 200 mL de BHI e, a cada duas horas, foi tomada a medida de absorbância a 600 nm, em espectrofotômetro. A cada leitura foram feitas diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e 0,1 mL foi transferido para placas contendo meio *tryptic soy agar* (TSA), empregando-se a técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas, a 28 °C/24 horas e, em sequência, as colônias foram quantificadas.

## 2.4 Influência da temperatura de armazenamento e pH do meio no crescimento de *P. fluorescens* em caldo de carne

Alíquotas adequadas do inóculo padronizado foram transferidas para 100 mL de caldo de carne (10 g extrato de carne, 10 g peptona de carne, 5 g tripton e 5 g glicose/1 L), na concentração final de  $10^4$  UFC/mL e incubadas às temperaturas de 4 °C, 7 °C e 12 °C.

O pH do meio de cultivo foi inicialmente ajustado para 5,5; 6,0 e 6,3, com solução de NaOH 2N e HCl 2N, em pHmetro (Digimed modelo DM20).

O crescimento de *P. fluorescens*, em cada valor de pH e temperatura (4 °C e pH 5,5; 4 °C e pH 6,0; 4 °C e pH 6,3; 7 °C e pH 5,5; 7 °C e pH 6,0; 7 °C e pH 6,3; 12 °C e pH 5,0; 12 °C e pH 6,0 e 12 °C e pH 6,3) foi acompanhado nos seguintes tempos: 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 72 horas, 84 horas, 96 horas, 108 horas e 120 horas, nos quais foram retiradas alíquotas de 1 mL de cultura e transferidas para tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, realizando-se diluições seriadas. Alíquotas de 0,01 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em placas contendo meio TSA, utilizando-se a técnica da microgota. As placas foram incubadas a 28 °C/ 24 horas e, em seguida, tiveram suas colônias quantificadas.

## 2.5 Análise dos dados de crescimento para a obtenção dos modelos

Foi empregada a metodologia de dois estágios para o desenvolvimento do modelo de crescimento de *P. fluorescens* em caldo de carne.

No primeiro estágio, a taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_m$ ) e a fase lag ( $\lambda$ ) foram estimadas para cada uma das combinações experimentais. Os parâmetros de crescimento foram obtidos pelo ajuste da equação modificada de

Gompertz e da equação de Baranyi e Roberts aos dados experimentais, por meio do programa DMFit 3.0.

As estimativas obtidas para  $\mu_{\max}$  foram ajustadas para o modelo de Ratkowsky estendido, para verificar o efeito da temperatura e do pH na taxa específica máxima de crescimento de *P.fluorescens*. Utilizou-se, para tanto, a seguinte equação:

$$\mu_{\max} = a (\text{pH} - \text{pH}_{\text{mim}}) \cdot (T - T_{\text{mim}})^2 \quad (1)$$

em que  $a$  é constante de regressão,  $\text{pH}_{\text{mim}}$  e  $T_{\text{mim}}$  são, respectivamente, o pH mínimo e a temperatura mínima teoricamente estimados para o crescimento dos micro-organismos.

## 2.6 Validação dos resultados pela análise estatística dos modelos

Para a verificação dos modelos foram calculados os parâmetros estatísticos coeficiente de correlação ( $R^2$ ), erro quadrado médio (EQM), fator bias e fator exatidão (SAMAPUNDO et al., 2005).

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva. Quanto mais próximo de um, melhor o ajuste do modelo.

O erro quadrado médio (EQM) é dado pela Equação 14 e apresenta o erro do modelo em relação aos dados, ou seja, o quanto os valores preditos são próximos dos valores observados. Portanto, quanto mais próximo de zero, melhor o ajuste.

Na Equação 2,  $\text{valor}_{\text{obs}}$  é o valor experimental,  $\text{valor}_{\text{pred}}$  é o valor predito pelo modelo, SQR é a soma dos quadrados residuais e  $n$  é o número de graus de liberdade (número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

$$EQM = SQR/n = \sum (valor_{obs} - valor_{pred})^2 / n \quad (2)$$

O fator bias, que é apresentado na Equação 3, procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio.

$$\text{Fator bias} = 10^{\left( \frac{\sum \log(valor_{observado} / valor_{predito})}{n} \right)} \quad (3)$$

Na Equação 3, *valorobservado* é o valor experimental, *valorpredito* é o valor predito pelo modelo e *n* é o número de dados menos os parâmetros do modelo.

O fator exatidão é o parâmetro estatístico mais idôneo e rigoroso, pois utiliza os valores preditos e os observados, avaliando a porcentagem de erro na predição. Este fator só leva em conta os valores absolutos. Quanto mais próximo de 1, menor a porcentagem de erro. O cálculo do fator exatidão foi realizado aplicando-se a Equação 4.

$$\text{Fator de exatidão} = 10^{\left( \frac{\sum |\log(valor_{observado} / valor_{predito})|}{n} \right)} \quad (4)$$

em que *valorobservado* é o valor experimental; *valorpredito* é o valor predito pelo modelo e *n* é o número de dados menos os parâmetros do modelo.

## 2.7 Validação gráfica

Para facilitar a compreensão, foi também utilizada a validação gráfica, obtida por meio da construção de gráficos de erro percentual relativo (ER), sendo ER calculado por meio da fórmula:

$$\% \text{ erro relativo (ER)} = (v_{\text{obs}} - v_{\text{pred}} / v_{\text{obs}}) \times 100 \quad (5)$$

em que  $v_{\text{obs}}$  se refere ao valor experimental e  $v_{\text{pred}}$  se refere ao valor predito pelo modelo. Assim é possível determinar a zona de erro relativo.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Modelagem primária do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em caldo de carne

Na Tabela 1 observam-se os parâmetros de crescimento para *P. fluorescens*, nos três diferentes valores de temperatura e pH testados.

Tabela 1 Parâmetros de crescimento observado para *P. fluorescens* em caldo de carne, a 4 °C, 7 °C e 12 °C, em pH 5,5; 6,0 e 6,3

Condições de cultivo	Baranyi e Roberts		Gompertz	
	$\lambda$ (h)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
4 °C e pH 5,5	19,99	0,040149	-	0,030961
4 °C e pH 6,0	18,64	0,043955	18,63	0,042155
4 °C e pH 6,3	19,65	0,043430	20,59	0,042679
7 °C e pH 5,5	20,86	0,082562	19,75	0,075270
7 °C e pH 6,0	18,74	0,081530	16,43	0,070892
7 °C e pH 6,3	14,89	0,071963	14,42	0,067418
12 °C e pH 5,5	8,27*10-8	0,087592	-	0,070049
12 °C e pH 6,0	7,91*10-8	0,092016	-	0,074098
12° C e pH 6,3	1,43*10-7	0,100424	-	0,086309

Na Tabela 2 encontram-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o erro quadrático médio (EQM) para os modelos primários.

Tabela 2 R<sup>2</sup> e EQM para modelagem primaria do crescimento de *P. fluorescens*

Condição de Crescimento	Baranyi e Roberts		Gompertz	
	R <sup>2</sup>	EQM	R <sup>2</sup>	EQM
4 °C e pH 5,5	0,98	0,1701	0,97	0,2105
4 °C e pH 6,0	0,99	0,1026	0,99	0,0959
4 °C e pH 6,3	0,99	0,8333	0,99	0,0854
7 °C e pH 5,5	0,989	0,1703	0,996	0,1077
7 °C e pH 6,0	0,990	0,1469	0,993	0,1284
7 °C e pH 6,3	0,992	0,1400	0,994	0,1154
12 °C e pH 5,5	0,987	0,1815	0,972	0,2612
12 °C e pH 6,0	0,991	0,1614	0,979	0,2505
12 °C e pH 6,3	0,984	0,2126	0,968	0,2967

Na Tabela 3 é possível visualizar os modelos de Baranyi e Roberts e Gompertz modificado, gerados para *P. fluorescens* a 4 °C, 7 °C e 12 °C, em pH 5,5; 6,0 e 6,3.

Tabela 3 Modelos de Baranyi e Roberts para crescimento de *P. fluorescens*, a 4 °C, 7 °C e 12 °C, em pH 5,5; 6,0 e 6,3

Modelo	Condição de crescimento	Equação
Baranyi e Roberts	4 °C pH 5,5	$dN/dt = -2,23159 \cdot 0,040149 \cdot [1 - N(t)/7,412011] \cdot N(t)$
	4 °C pH 6,0	$dN/dt = -2,2691713 \cdot 0,043955 \cdot [1 - N(t)/7,225329] \cdot N(t)$
	4 °C pH 6,3	$dN/dt = -2,3479932 \cdot 0,04343 \cdot [1 - N(t)/7,281148] \cdot N(t)$
Gompertz	4 °C pH 5,5	$\text{LogN}(t) = 3,797973 + 3,62246489 \exp\{-\exp[-0,023233(t-43,04189)]\}$
	4 °C pH 6,0	$\text{LogN}(t) = 3,952039 + 3,19371571 \exp\{-\exp[-0,03588(t-46,49816)]\}$
	4 °C pH 6,3	$\text{LogN}(t) = 3,952664 + 3,24166902 \exp\{-\exp[-0,035789(t-48,53329)]\}$
Baranyi e Roberts	7 °C e pH 5,5	$dN/dt = 5,5991153 \cdot 0,082562 \cdot [1 - N(t)/8,264927] \cdot N(t)$
	7 °C e pH 6,0	$dN/dt = -4,6091953 \cdot 0,08153 \cdot [1 - N(t)/8,163269] \cdot N(t)$
	7 °C e pH 6,3	$dN/dt = 2,9202683 \cdot 0,071963 \cdot [1 - N(t)/8,157786] \cdot N(t)$
	7 °C e pH 5,5	$\text{LogN}(t) = 4,344648 + 3,8213554 \exp\{-\exp[-0,053543(t-38,4268)]\}$
Gompertz	7 °C e pH 6,0	$\text{LogN}(t) = 4,523484 + 3,56886414 \exp\{-\exp[-0,053996(t-34,94508)]\}$
	7 °C e pH 6,3	$\text{LogN}(t) = 4,361284 + 3,66777251 \exp\{-\exp[-0,49965(t-34,4322)]\}$
Baranyi e Roberts	12 °C e pH 5,5	$dN/dt = -1 \cdot 0,087592 \cdot [1 - N(t)/7,25E-09] \cdot N(t)$
	12 °C e pH 6,0	$dN/dt = -1 \cdot 0,092016 \cdot [1 - N(t)/7,28E-09] \cdot N(t)$
	12 °C e pH 6,3	$dN/dt = -1 \cdot 0,0100424 \cdot [1 - N(t)/1,44E-08] \cdot N(t)$
Gompertz	12 °C e pH 5,5	$\text{LogN}(t) = 3,79214 + 3,93009306 \exp\{-\exp[-0,04845(t-20,63974)]\}$
	12 °C e pH 6,0	$\text{LogN}(t) = 4,17734 + 4,31045923 \exp\{-\exp[0,046728(t-21,40046)]\}$
	12 °C e pH 6,3	$\text{LogN}(t) = 4,053301 + 4,15074063 \exp\{-\exp[0,056523(t-17,69189)]\}$

Pela análise dos parâmetros de crescimento gerados pelos modelos primários (Tabela 1) nota-se que, no geral, os diferentes valores de pH testados não influenciaram tanto o crescimento de *P. fluorescens* quando se manteve a temperatura fixa. Isto é perceptível, por exemplo, considerando a concentração de 5 log UFC/mL, valor este no qual se inicia o processo deteriorativo. Este nível populacional é atingido por volta de 50 horas, em todas as três condições, independente do valor do pH (APÊNDICE A). Por outro lado, observa-se que à medida que se eleva a temperatura de armazenamento, a duração da fase lag diminui e a inclinação da fase exponencial aumenta, se considerarmos a elevação da temperatura de 4 °C para 12 °C. Esse comportamento faz com que as populações alcancem cerca de 6 log UFC/ml em torno de 70 horas, 40 horas e 24 horas, para as temperaturas de crescimento de 4 °C, 7 °C e 12 °C, respectivamente (APÊNDICE A).

Percebe-se que, a 7 °C, o ajuste dos dois modelos primários aos dados experimentais gerou, na condição de 7 °C e pH 5,5, maior fase lag. Por outro lado, no maior valor de pH testado, 6,3, os tempos de adaptação ( $\lambda$ ) foram os menores. Provavelmente, isso se deve ao fato de que a maioria das bactérias tem seu ponto ótimo de crescimento próximo da neutralidade, ou seja, em pH = 7,0. Entretanto, apesar das condições de crescimento a 7 °C, em valores mais ácidos de pH (5,5) apresentarem maior fase lag. Nestas condições apresentaram também maior  $\mu_{max}$ . Esse comportamento é o contrário do observado em trabalhos como, por exemplo, o de Gospavic et al. (2008) e o de Koutsomanis et al. (2002), em que quanto maior a fase lag, menor a taxa máxima de crescimento. Porém, isso é observado nestes trabalhos quando comparados, no geral, em uma faixa mais ampla de temperatura, 0-15 °C e de 0-20 °C. Ressalta-se que, em Gospavic et al. (2008), o crescimento de *Pseudomonas* spp. ajustado ao modelo de Gompertz modificado obteve aumento de fase lag entre 2 °C e 4 °C, coincidindo também com o aumento de  $\mu_{max}$ . A relação de diminuição de  $\lambda$  e

o aumento de  $\mu_{\max}$  ficam nítidos quando se compara o valor desses parâmetros a 2 °C e a 4 °C com valores obtidos a 15 °C e 20 °C.

A 12 °C, os valores de  $\lambda$  estimados pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados experimentais foram bem pequenos. Já pelo modelo de Gompertz modificado esses nem foram estimados, mostrando que, a 12 °C, praticamente não houve fase lag.

Com relação ao aumento de temperatura de 7 °C para 12 °C, nota-se, pelos dados da Tabela 1, que esse aumento na temperatura provocou a diminuição da fase lag, porém, não alterou significativamente a taxa específica máxima de crescimento. Quando se comparam as condições de crescimento a 4 °C e a 12 °C, ou seja, em uma amplitude maior, para crescimento de *P. fluorescens*, percebe-se que  $\lambda$  diminui consideravelmente, enquanto  $\mu_{\max}$  aumenta, também consideravelmente.

O modelo de Gompertz modificado não estimou valor para  $\lambda$  na condição de crescimento de 4 °C e pH 5,5 e nem nas condições a 12 °C. Como, na realização do experimento, a cultura bacteriana de *P. fluorescens* foi previamente ativada antes de ser inoculada no caldo de carne, em alguns casos, ocorreu supressão dessa fase de adaptação. Soma-se a isso, o fato de o modelo de Gompertz não considerar a fase de adaptação (fase lag), mas apenas o aumento do número de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial (BARANYI et al., 2005). Portanto, em algumas condições de crescimento esta fase não foi estimada por este modelo.

Pela análise do efeito conjunto do pH do meio e da temperatura de incubação sobre o crescimento de *P. fluorescens*, nota-se que, de maneira geral, quanto maior a temperatura e quanto maior o pH, maior a taxa específica máxima de crescimento e menor a fase lag. Assim, carnes com pH inicial mais próximo da neutralidade e armazenadas em temperaturas de abuso terão sua vida útil diminuída.

Para todas as condições de crescimento apresentadas na Tabela 2, os dados experimentais apresentaram bom ajuste aos modelos primários aplicados, fato mostrado pelos valores de  $R^2$ , os quais se encontram bem próximos a 1 e pelos baixos valores de EQM observados, mostrando que os valores preditos estão próximos aos observados, o que garante a validação desses dados. Gospavic et al. (2008), modelando o crescimento de *Pseudomonas* spp. em carne de aves sob condições variáveis de temperatura, também encontraram bom ajuste dos modelos de Baranyi e Roberts e Gompertz modificado aos dados de crescimento.

Uma vez validadas as equações obtidas (Tabela 3), elas podem ser utilizadas para a predição de crescimento de *P. fluorescens* em caldo de carne, nas condições de cultivo testadas.

Portanto, para as condições de crescimento descritas, é possível saber, a qualquer concentração celular, qual a taxa de variação dessa concentração com o tempo pelas equações geradas a partir de Baranyi e Roberts e, a qualquer tempo, qual a concentração celular pelas equações geradas a partir de Gompertz modificado.

Muitas pesquisas combinam a análise sensorial à microbiologia preditiva para estimar a vida útil de um determinado alimento. Por exemplo, Taoukis, Koutsoumanis e Nychas (1999) estimaram, por parâmetros sensoriais, que a vida útil de carne de aves contaminada por *Pseudomonas* spp. chegava ao final quando o crescimento populacional alcançava 7 log UFC/g por meio das curvas de predição obtidas com modelos primários e calcularam, nas condições ambientais testadas, o tempo para o crescimento alcançar este índice de 7 log UFC/g, sendo este tempo considerado o final da vida útil da carne. Os modelos de predição, então, também são utilizados para a estimativa de vida útil.

### 3.2 Modelagem secundária do crescimento de *P. fluorescens* em caldo de carne

Na Tabela 4 observam-se os modelos secundários gerados para modelar efeito da temperatura e do pH na taxa específica de crescimento máxima

Tabela 4 Equações modelos secundários para *P. fluorescens*

Modelo primário	Modelo secundário da raiz quadrada
Baranyi e Roberts	$\mu_{\max} = 0,0000267 * [(T - (-14,6619))^2]^* (pH - 0,707962)$
Gompertz	$\mu_{\max} = 0,00000224 * [(T - (-64,1401))^2]^* (pH - 0,631746)$

Os parâmetros estatísticos para validação do ajuste dos modelos secundários aos dados de crescimento encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 Parâmetros estatísticos,  $R^2$ , EQM, fator bias e fator exatidão, para validação modelagem secundária de *P. fluorescens*

Modelos	$R^2$	EQM	F. bias	F. exatidão
1	0,7134	0,0243	0,9990	1,6233
2	0,2310	0,0351	0,9781	2,6231

1 modelo da raiz quadrada gerado a partir modelo de Baranyi e Roberts, 2 modelo da raiz quadrada gerado a partir modelo de Gompertz modificado

Já na Figura 1 mostra-se a validação gráfica dos modelos secundários gerados para *P. fluorescens*.

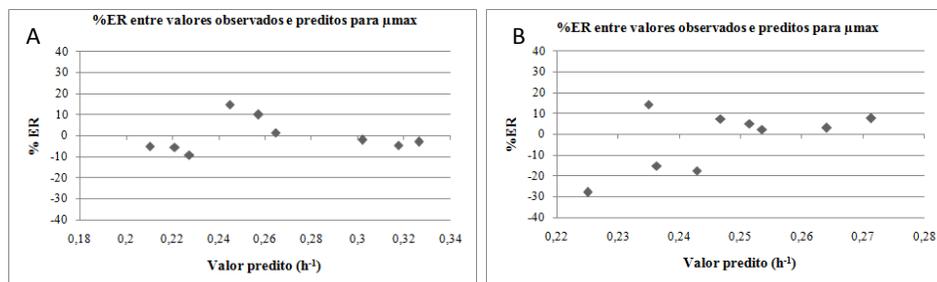


FIGURA 1 Erro percentual relativo (ER) entre valores observados e valores preditos para  $\mu_{\max}$  de *P. fluorescens* A: modelo secundário gerado a partir de Baranyi e Roberts, B: modelo secundário gerado a partir de Gompertz modificado

Pela análise visual dos gráficos da Figura 1 é nítido que a zona de erro da modelagem secundária a partir do modelo primário de Gompertz (Gráfico B) é maior, confirmando o que foi observado pela validação estatística.

Portanto, considerando os parâmetros estatísticos e a validação gráfica, tem-se o modelo secundário de Ratkowsky para avaliação da influência dos fatores pH e temperatura de incubação no crescimento de *P. fluorescens* melhor validado com a sua construção a partir de dados primários ( $\mu_{\max}$ ) gerados pelo modelo de Baranyi e Roberts.

#### 4 CONCLUSÃO

Os modelos primários gerados apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, podendo ser utilizados para a predição do crescimento de *P. fluorescens* nas mesmas condições testadas. Já a modelagem secundária usando o modelo de Ratkowsky a partir de dados primários obtidos pelo modelo de Baranyi foi mais bem validada do que quando comparado com o obtido a partir

de Gompertz, principalmente porque este último apresentou baixa qualidade de ajuste dos modelos.

Assim, para predição da influência do pH e temperatura no crescimento de *P. fluorescens* recomenda-se o uso do modelo secundário obtido a partir do modelo primário de Baranyi.

Nota-se, pela modelagem primária, que a elevação ou a diminuição do pH pouco influenciaram os parâmetros de crescimento, sendo a influência da temperatura mais nítida. Com relação ao efeito combinado de temperatura e pH, em geral, nota-se que a elevação da temperatura concomitante com a elevação do pH provoca aumento de  $\mu_{\max}$  e diminuição de  $\lambda$ , o que acarreta em diminuição da vida útil, especialmente considerando a temperatura de abuso testada.

## REFERÊNCIAS

BARANYI, J. et al. Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 1-3, p. 13–19, Apr. 2005.

COATES, K. J. et al. The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork. **Food Microbiology**, London, v. 12, p. 49–54, Feb. 1995.

ERCOLINI, D. et al. Mesophilic and Psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 1990-2001, Apr. 2009.

GILL, C. O.; NEWTON, K. G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**, Barking, v. 2, n. 3, p. 207-217, July 1978.

GOSPAVIC, R. et al. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 290-297, Oct. 2008.

JAY, J. M. I. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711 p.

KOUTSOUMANIS, K. et al. Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 2-3, p. 375-382, Mar. 2002.

LEBERT, I.; BEGOT, C.; LEBERT, A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25 C). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 53–56, Jan. 1998.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: aspectos básicos da microbiologia preditiva. **Brasilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 3, p. 41-51, 2000.

SAMAPUNDO, S. et al. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 35-52, July 2005.

TAOUKIS, P. S.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 21-31, Dec. 1999.

WIDDERS, P. R. et al. Controlling microbial contamination on beef and lamb meat during processing. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 72, n. 6, p. 208-211, June 1995.

ZHOU, K. et al. Predictive modeling and validation of growth at different temperatures of *Brochothrix thermosphacta*. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 29, n. 3, p. 460-473, Aug, 2009.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A- Curvas da modelagem primária do crescimento de *P. fluorescens*, nos diferentes valores de temperaturas e pH testados

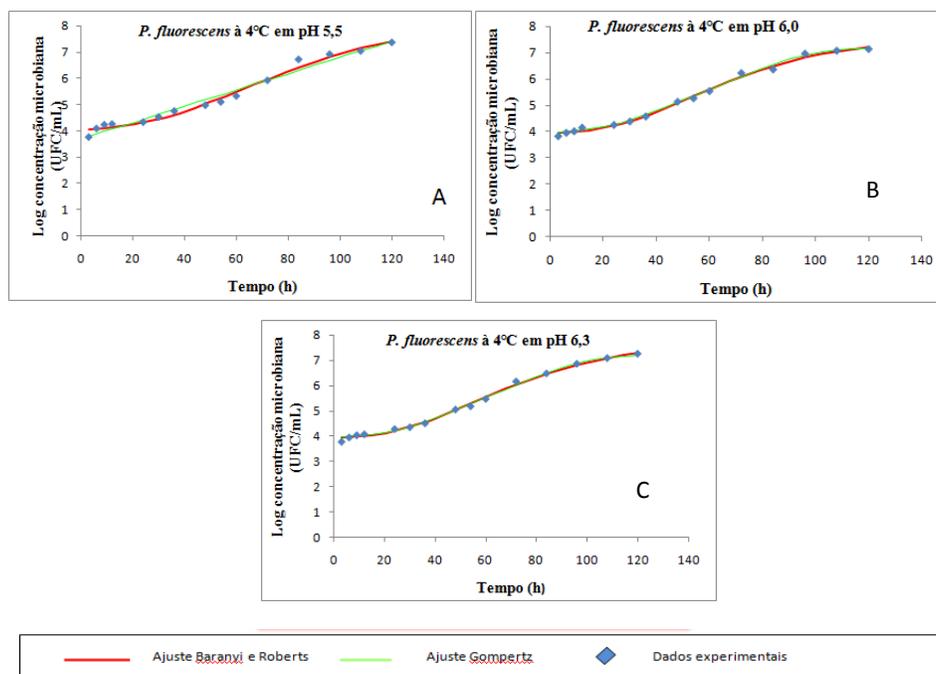


Figura 1 Modelagem primária do crescimento de *P. fluorescens* a 4 °C, em pH 5,5 (A), em pH 6,0 (B) e em pH 6,3 (C)

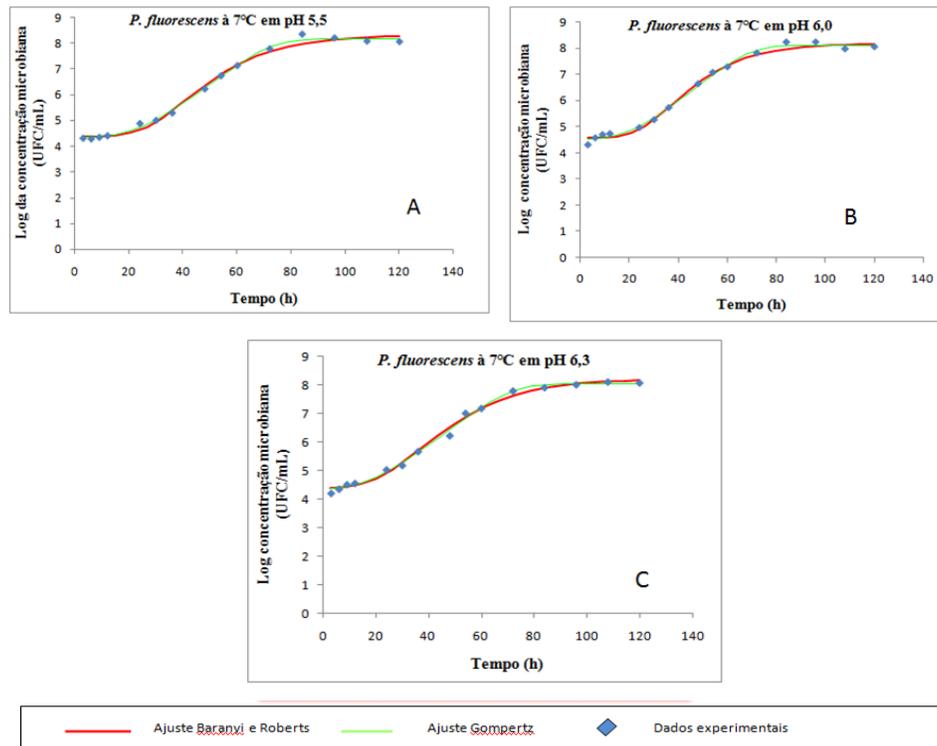


Figura 2 Modelagem primária do crescimento de *P. fluorescens* a 7 °C, em pH 5,5 (A), em pH 6,0 (B) e em pH 6,3 (C)

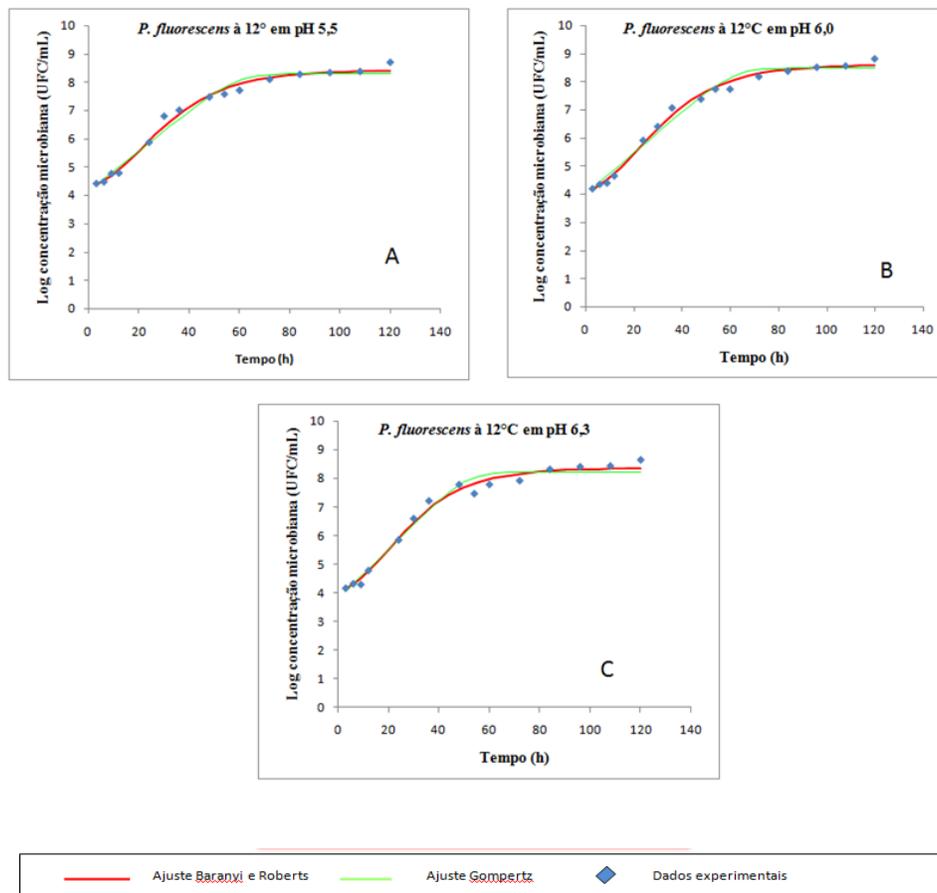


Figura 3 Modelagem primária do crescimento de *P. fluorescens* a 12 °C em pH 5,5 (A), em pH 6,0 (B) e em pH 6,3 (C)

**TERCEIRA PARTE - MODELAGENS PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DO  
CRESCIMENTO DE *Brochothrix thermosphacta* EM DIFERENTES  
VALORES DE TEMPERATURAS E pH**

## RESUMO

*Bochothrix thermosphacta* é um psicrotrófico aeróbio facultativo, relacionado com a deterioração de carnes acondicionadas aerobicamente ou em embalagens modificadas com baixas concentrações de oxigênio. Em aerobiose, esse microorganismo pode degradar componentes da carne refrigerada, como glicose, ribose e aminoácidos, liberando metabólitos, acetoína e diacetil, responsáveis por sabor e odor desagradáveis que tornam esse alimento sensorialmente rejeitado pelos consumidores. Para se ter maior controle da qualidade do alimento que se produz e assim evitar prejuízo de imagem perante os consumidores e prejuízos devido à perda de uma carga refrigerada por contaminação, pode-se utilizar a microbiologia preditiva como instrumento de garantia da qualidade e segurança de alimentos, já que ela permite, pelo uso dos modelos de matemáticos, prever a resposta microbiana, baseada em observações passadas, a determinadas condições. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de modelar o crescimento de *B. thermosphacta* em caldo de carne ajustado para diferentes valores iniciais de pH e incubado em diferentes temperaturas, incluindo temperaturas de refrigeração e de abuso. Para isso, os dados experimentais de crescimento foram ajustados aos modelos primários de Baranyi e Roberts e ao modelo de Gompertz modificado, para a obtenção dos parâmetros de crescimento,  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$ . Os dados obtidos para  $\mu_{\max}$  foram ajustados ao modelo secundário de Ratkowsky estendido para verificar a influência da temperatura e do pH neste parâmetro de crescimento para *B. thermosphacta*. Todos os modelos testados apresentam bom ajuste aos dados experimentais, o que os tornam validados e disponíveis para predição do crescimento de *B. thermosphacta* nas mesmas condições testadas experimentalmente.

Palavras-chave: Deterioração, Refrigeração, Modelos preditivos

**ABSTRACT**

*Bochothrix thermosphacta* is a psychrotrophic bacterial aerobic facultative, related to the deterioration of meat wrapped in packages aerobically or modified with low concentrations of oxygen. In aerobic this microorganism can degrade components of the chilled meat as glucose, amino acids and ribose releasing metabolites, acetoin and diacetyl, responsible for taste and odor unpleasant that make this food sensorially rejected by consumers. To have more control of the quality of the food that is produced and thus prevent image burn to consumers and losses due loss of a refrigerated cargo for contamination, you can use the predictive microbiology as a tool for quality assurance and food safety. Since this allows by using the mathematical models, predict the microbial response based on past observations, in certain conditions. So this worked aimed to develop predictive models for analyzing the behavior of *B. thermosphacta* in broth adjusted to different values of initial pH and incubated at different temperatures, including temperatures of refrigeration and abuse. For this, experimental data growth models were fitted to Baranyi and Roberts and modified Gompertz primary model to obtain the growth parameters,  $\lambda$  and  $\mu_{\max}$ . The data were adjusted for  $\mu_{\max}$  to model secondary Ratkowsky extended to determine the influence of temperature and pH on growth of this parameter for *B. thermosphacta*. All tested models show a good fit to data, making them available and validated for predicting growth of *B. thermosphacta* in fresh tested experimentally under the same conditions.

Keywords: Deterioration, Refrigeration, Predictive models.

## 1 INTRODUÇÃO

Geralmente, as bactérias estão ausentes ou presentes em níveis muito baixos em tecidos musculares de animais saudáveis. Isso se deve às barreiras de proteção inerentes (peles, couro) e os mecanismos naturais de defesa antimicrobianos (lisozima, peptídeos antimicrobianos) do animal vivo, os quais são destruídos no momento do abate, fazendo com que a carne resultante torne-se exposta a níveis crescentes de contaminantes e, dependendo de vários parâmetros, pode sofrer rápida decomposição microbiana (NYCHAS et al., 2008).

Essa decomposição é, em grande parte, causada pela espécie psicrotrófica *Brochothrix thermosphacta* que representa um componente significativa da deterioração microbiana de carnes. Para este micro-organismo, a carne é um meio de crescimento em que pode crescer tanto em condições aeróbias quanto em condições anaeróbias, produzindo fortes odores indesejáveis (PIN et al., 2002) associados com a produção de acetoína, diacetil e 3-metilbutanol (DAINTY; MACKKEY, 1992).

Estudo recente de Nowak e Piotrowska, (2012), sobre a degradação microbiana de *B. thermosphacta* em carnes e produtos cárneos, revelou que diferentes cepas de *B. thermosphacta* produzem diferentes hidrolases que degradam a carne. Algumas cepas são capazes de degradar proteína ou, ainda, de produzir proteases com diferentes especificidades de substratos.

Para avaliar a qualidade da carne durante o armazenamento ou o transporte frigorificado, se esta foi inicialmente contaminada com *B. thermosphacta*, pode-se usar a microbiologia predita. Essa ferramenta visa fornecer modelos confiáveis para simulações de comportamento microbiano em produtos alimentares (COUVERT et al., 2010). Portanto, o uso dos modelos preditivos pode ter aplicação muito eficiente na indústria de alimentos, providenciando previsões seguras o suficiente para evitar riscos à saúde dos

consumidores, além de tornar o processo viável economicamente, por diminuir perdas e ajudar na tomada de decisões (JUNEJA; MARKS; HUANG,2003).

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de modelar e validar modelos matemáticos que descrevam o crescimento de *Brochothrix thermosphacta* em diferentes temperaturas e pH.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local e condução do experimento**

A obtenção das curvas de crescimento nos tempos e temperaturas testados se deu no Laboratório de Microbiologia no Departamento Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

### **2.2 Micro-organismo utilizado**

Foi utilizada a bactéria *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509.

### **2.3 Padronização e manutenção do inoculo**

A cepa liofilizada foi ativada em caldo BHI e incubada, a 28 °C/24 horas. Após a ativação, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos Eppendorf, que foram centrifugados a 3000 x g/ 5 min em microcentrífuga (Eppendorf). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e alíquotas de 1 mL de meio de congelamento (15 mL de glicerol, 0,5 g de peptona bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl, 100 mL de água destilada) foram utilizadas para ressuspensão das células. Após homogeneização, as culturas foram mantidas em freezer, a -18 °C.

Para a utilização das cepas, elas foram ativadas em caldo BHI e incubadas, a 28 °C/24 horas. Após a ativação, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos contendo caldo BHI e incubadas, a 28 °C, até a obtenção do número de células necessárias à padronização.

Para a padronização dos inóculos, o desenvolvimento de *B. thermosphacta* foi acompanhado até o estacionamento do crescimento. Para isso, 0,1 mL do inóculo ativado foi transferido para 200 mL de BHI e, a cada duas horas, foi tomada a medida de absorbância, a 600 nm, em espectrofotômetro. A cada leitura foram feitas diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e 0,1 mL foi transferido para placas contendo meio *tryptic soy Agar* (TSA), por meio da técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas, a 28 °C, por 24 horas e, na sequência, as colônias foram quantificadas.

#### **2.4 Influência da temperatura de armazenamento e do pH do meio no crescimento de *B. thermosphacta* em caldo de carne**

Alíquotas adequadas dos inóculos padronizados foram transferidas para 100 mL de caldo de carne (10 g extrato de carne + 10 g peptona de carne + 5 g triptona + 5 g glicose/1 L), na concentração final de  $10^4$  UFC/mL e incubados nas temperaturas de 4 °C, 7 °C e 12 °C.

O pH do meio de cultivo foi inicialmente ajustado para 5,5; 6,0 e 6,3, com solução de NaOH 2N e HCl 2N, em pHmetro marca Digimed modelo DM20.

O crescimento de *B. thermosphacta*, em cada valor de pH e temperatura (4 °C e pH 5,5; 4 °C e pH 6,0; 4 °C e pH 6,3; 7 °C e pH 5,5; 7 °C e pH 6,0; 7 °C e pH 6,3; 12 °C e pH 5,0; 12 °C e pH 6,0 e 12 °C e pH 6,3), foi acompanhado nos seguintes tempos: 3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas, 24 horas, 30 horas, 36

horas, 48 horas, 54 horas, 60 horas, 72 horas, 84 horas, 96 horas, 108 horas e 120 horas, nos quais foram retiradas alíquotas de 1 mL de cultura e transferidas para tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, realizando-se diluições seriadas. Alíquotas de 0,01mL das diluições adequadas foram plaqueadas em placas contendo meio TSA, utilizando a técnica da microgota. As placas foram incubadas, a 28 °C, por 24 horas e, em seguida, tiveram suas colônias quantificadas.

## 2.5 Análise dos dados de crescimento para obtenção dos modelos

Foi empregada a metodologia de dois estágios para desenvolvimento do modelo de crescimento de *B. thermosphacta* em caldo de carne.

No primeiro estágio, a taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_m$ ) e a fase lag ( $\lambda$ ) foram estimadas para cada uma das combinações experimentais. Os parâmetros de crescimento foram obtidos pelo ajuste da equação modificada de Gompertz e da equação de Baranyi e Roberts aos dados experimentais, por meio do uso do programa DMFit 3.0.

As estimativas que foram obtidas para  $\mu_{max}$  foram ajustadas para o modelo de Ratkowsky estendido, para verificar o efeito da temperatura e do pH na taxa específica máxima de crescimento de *B. thermosphacta*. Para tanto, utilizou-se a seguinte equação:

$$\mu_{max} = a (\text{pH} - \text{pH}_{\text{mim}}) \cdot (T - T_{\text{mim}})^2 \quad (1)$$

em que  $a$  é a constante de regressão,  $\text{pH}_{\text{mim}}$  e  $T_{\text{mim}}$  são, respectivamente, o pH mínimo e a temperatura mínima teoricamente estimados para o crescimento dos micro-organismos.

## 2.6 Validação dos resultados pela análise estatística dos modelos

Para a verificação dos modelos foram calculados os parâmetros estatísticos coeficiente de correlação ( $R^2$ ), erro quadrado médio (EQM), fator bias e fator exatidão (SAMAPUNDO et al., 2005).

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva. Quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo.

O erro quadrado médio (EQM) é dado pela Equação 2 e apresenta o erro do modelo em relação aos dados, ou seja, quanto os valores preditos são próximos dos valores observados. Portanto, quanto mais próximo de zero, melhor o ajuste.

Na Equação 2,  $valor_{obs}$  é o valor experimental,  $valor_{pred}$  é valor predito pelo modelo, SQR é a soma dos quadrados residuais, n é o número de graus de liberdade (número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

$$EQM = SQR/n = \sum (valor_{obs} - valor_{pred})^2 / n \quad (2)$$

O fator bias, que está apresentado na Equação 3, procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio.

$$\text{Fator bias} = 10^{\left( \frac{\sum \log(valor_{observado} / valor_{predito})}{n} \right)} \quad (3)$$

Na Equação 3,  $valor_{observado}$  é o valor experimental,  $valor_{predito}$  é o valor predito pelo modelo e n é o número de dados menos os parâmetros do modelo.

O fator exatidão é o parâmetro estatístico mais idôneo e rigoroso, pois usa os valores preditos e os observados, avaliando a porcentagem de erro na predição. Este fator só leva em conta os valores absolutos. Quanto mais próximo de 1, menor a porcentagem de erro. O cálculo do fator exatidão foi realizado aplicando-se a Equação 4.

$$\text{Fator de exatidão} = 10^{\left(\sum \frac{|\log(\text{valorobservado}/\text{valorpredito})|}{n}\right)} \quad (4)$$

em que *valorobservado* é o valor experimental; *valorpredito* é o valor predito pelo modelo e *n* é o número de dados menos os parâmetros do modelo.

## 2.7 Validação gráfica

Para facilitar a compreensão, foi também utilizada a validação gráfica, obtida por meio da construção de gráficos de erro percentual relativo (ER), sendo ER calculado por meio da fórmula 5

$$\% \text{ erro relativo (ER)} = (v_{\text{obs}} - v_{\text{pred}}/v_{\text{obs}}) \times 100 \quad (5)$$

em que  $v_{\text{obs}}$  se refere ao valor experimental e  $v_{\text{pred}}$  se refere ao valor predito pelo modelo. Assim, é possível determinar a zona de erro relativo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Modelagem primária do crescimento de *Brochothrix thermosphacta* em caldo de carne

Na Tabela 1 encontram-se os valores de  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  para *B. thermosphacta* a 4 °C, 7 °C e 12 °C, nos três valores de pH, 5,5; 6,0 e 6,3 ajustados.

Tabela 1 Parâmetros de crescimento observado para *B. thermosphacta* em caldo de carne a 4 °C, 7 °C e 12 °C, em pH 5,5; 6,0 e 6,3

Condições de cultivo	Baranyi e Roberts		Gompertz	
	$\lambda$ (h)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
4 °C e pH 5,5	4,85	0,036423	-	0,029839
4 °C e pH 6,0	3,24E-07	0,048561	-	0,042477
4 °C e pH 6,3	1,86E-07	0,043232	-	0,035897
7 °C e pH 5,5	13,29	0,065708	11,87	0,060474
7 °C e pH 6,0	10,05	0,078342	8,26	0,070011
7 °C e pH 6,3	6,38	0,073423	-	0,060197
12 °C e pH 5,5	1,41E-06	0,092588	-	0,076627
12 °C e pH 6,0	2,63	0,10998	-	0,090355
12 °C e pH 6,3	1,59	0,112014	-	0,093117

Na tabela 2 observam-se os parâmetros estatísticos  $R^2$  e EQM para validação da modelagem primária de *B. thermosphacta*, em todas as condições de temperatura e pH testados.

Tabela 2  $R^2$  e EQM para *B. thermosphacta* a 7 °C e 12 °C, em pH 5,5; 6,0 e 6,3

Condição de Crescimento	Baranyi e Roberts		Gompertz	
	$R^2$	EQM	$R^2$	EQM
4 °C e pH 5,5	0,99	0,1682	0,99	0,1764
4 °C e pH 6,0	0,98	0,1444	0,98	0,1453
4 °C e pH 6,3	0,98	0,1341	0,98	0,1348
7 °C e pH 5,5	0,994	0,1149	0,992	0,1356
7 °C e pH 6,0	0,993	0,1335	0,996	0,1047
7 °C e pH 6,3	0,996	0,1065	0,995	0,1144
12 °C e pH 5,5	0,993	0,1267	0,993	0,1267
12 °C e pH 6,0	0,995	0,1099	0,996	0,0958
12 °C e pH 6,3	0,989	0,1600	0,992	0,1358

As equações obtidas pelos modelos de Baranyi e Roberts e pelo modelo de Gompertz modificado para as condições de crescimento de *B. thermosphacta* a 4 °C, 7 °C e 12 °C, em pH 5,5; 6,0 e 6,3, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 Modelos primários para crescimento de *B. thermosphacta* a 4 °C, 7 °C e 12 °C, em pH 5,5; 6,0 e 6,3

Modelo	Condição de crescimento	Equação
Baranyi e Roberts	4 °C pH 5,5	$dN/dt = -1,1932043 * 0,036423 * [1 - N(t)/7,149077] * N(t)$
	4 °C pH 6,0	$dN/dt = -1 * 0,048561 * [1 - N(t)/7,701309] * N(t)$
	4 °C pH 6,3	$dN/dt = -1 * 0,043232 * [1 - N(t)/7,924358] * N(t)$
Gompertz	4 °C pH 5,5	$\text{LogN}(t) = 3,838248 + 3,49116117 \exp\{-\exp[-0,023233(t-43,04189)]\}$
	4 °C pH 6,0	$\text{LogN}(t) = 3,810863 + 3,81597145 \exp\{-\exp[-0,030258(t-33,04901)]\}$
	4 °C pH 6,3	$\text{LogN}(t) = 3,977424 + 4,19993083 \exp\{-\exp[-0,02323(t-43,04189)]\}$
Baranyi e Roberts	7 °C e pH 5,5	$dN/dt = 2,3944289 * 0,065708 * [1 - N(t)/7,978267] * N(t)$
	7 °C e pH 6,0	$dN/dt = 2,3944389 * 0,078342 * [1 - N(t)/8,258502] * N(t)$
	7 °C e pH 6,3	$dN/dt = 1,5980269 * 0,073423 * [1 - N(t)/8,353738] * N(t)$
Gompertz	7 °C e pH 5,5	$\text{LogN}(t) = 4,137266 + 3,70408461 \exp\{-\exp[0,044379(t-34,40365)]\}$
	7 °C e pH 6,0	$\text{LogN}(t) = 4,074842 + 4,05749568 \exp\{-\exp[0,046903(t-29,58479)]\}$
	7 °C e pH 6,3	$\text{LogN}(t) = 4,063964 + 4,17958697 \exp\{-\exp[0,039151(t-25,54234)]\}$
Baranyi e Roberts	12 °C e pH 5,5	$dN/dt = 1,0000001 * 0,092588 * [1 - N(t)/8,332531] * N(t)$
	12 °C e pH 6,0	$dN/dt = -1,3350782 * 0,10998 * [1 - N(t)/8,491625] * N(t)$
	12 °C e pH 6,3	$dN/dt = -1,195696 * 0,112014 * [1 - N(t)/8,472856] * N(t)$
Gompertz	12 °C e pH 5,5	$\text{LogN}(t) = 4,30574 + 3,93048849 \exp\{-\exp[-0,052994(t-18,86998)]\}$
	12 °C e pH 6,0	$\text{LogN}(t) = 4,448302 + 3,96353344 \exp\{-\exp[0,061968(t-16,13748)]\}$
	12 °C e pH 6,3	$\text{LogN}(t) = 4,510883 + 3,88615589 \exp\{-\exp[0,065133(t-15,35312)]\}$

Pela análise dos dados dispostos na Tabela 1 nota-se que a fase lag estimada pelo modelo de Baranyi e Roberts é bem curta nas condições testadas, sendo praticamente inexistente a 4 °C, em pH 6,0 e 6,3 e a 12 °C, em pH 5,5. Com relação à taxa específica máxima de crescimento, esta apresenta, em pH 6,0, valor mais elevado tanto a 4 °C quanto a 7 °C, fato confirmado pelos dois modelos aplicados, confirmando que o meio com pH 6,0 é mais favorável ao crescimento de *B. thermosphacta*. Esse crescimento mais acelerado em pH 6,0 é notável quando se compara o nível populacional alcançado por *B. thermosphacta*. Por exemplo, concentração em torno de 10<sup>6</sup> UFC/mL, ordem na qual os sinais deteriorativos começam a surgir, é alcançada em torno de 50 horas a 4 °C, em pH 6,0, enquanto, nas outras condições, pH 5,5 e 6,3, essa concentração é atingida apenas por volta de 70 horas. Portanto, pode-se inferir que carne com pH 5,5 ou 6,3, armazenada a 4 °C, se conserva melhor do que com pH 6,0 (APÊNDICE A).

O fato de o crescimento de *B. thermosphacta* apresentar fase lag de curta duração em todas as condições testadas ocorreu, provavelmente, devido à etapa de ativação da cultura antes de inoculação em caldo de carne.

Nota-se também, a 7 °C, um decréscimo da duração da fase lag de 13,28 horas para 6,28 horas, à medida que o pH torna-se mais próximo da neutralidade

Já a análise dos parâmetros de crescimento a 12 °C mostra a fase lag, estimada apenas pelo modelo de Baranyi e Roberts, bem curta, especialmente em pH 5,5 e aumento de  $\mu_{\max}$  à medida que se eleva o pH.

Ao se analisar o comportamento de *B. thermosphacta* em relação à elevação da temperatura de 7 °C (ideal para refrigeração) para 12 °C (temperatura de abuso), observa-se diminuição considerável da fase lag, de 13,28h; 10,05h e 6,38h para 1,41\*10<sup>-6</sup>h; 2,36h e 1,59h, em pH 5,5; 6,0 e 6,3 respectivamente. Nota-se também aumento nas taxas específicas de crescimento máximo de 0,065708 h<sup>-1</sup>, 0,078342 h<sup>-1</sup> e 0,073423 h<sup>-1</sup>, em pH 5,5; 6,0 e 6,3,

respectivamente, pelo modelo de Baranyi e Roberts, para  $0,092588 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,10998 \text{ h}^{-1}$  e  $0,112014 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente e de  $0,060474 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,070011 \text{ h}^{-1}$  e  $0,060197 \text{ h}^{-1}$ , em pH 5,5; 6,0 e 6,3, respectivamente, pelo modelo de Gompertz modificado para  $0,076627 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,090355 \text{ h}^{-1}$  e  $0,093117 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Já a comparação dos valores preditos para  $\mu_{\max}$ , quando a temperatura passa de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , ideal para refrigeração, para  $12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura de abuso, percebe-se que essas taxas mais que dobram. Ressalta-se, assim, a importância o uso de baixas temperaturas para retardar o aparecimento de alterações na carne que ocorrem pelo desenvolvimento de bactérias deterioradoras (ERCOLINI et al, 2009).

A elevação da temperatura de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  provocou o aumento da fase lag de 4,85h para 13,29h, porém, depois de  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para  $12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , decaiu para  $1,41 * 10^{-6}$ .

A comparação de todas as condições de crescimento aplicadas ao *B. thermosphacta* mostra que à medida que a temperatura é elevada,  $\mu_{\max}$  também se eleva e que a elevação do pH resultou em aumento de  $\mu_{\max}$  apenas a  $12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , já que, nas outras temperaturas testadas, notou-se que o crescimento no pH intermediário testado (6,0) apresentou maior  $\mu_{\max}$  e o aumento de pH resultou também em diminuição de  $\lambda$ , em duas condições de temperatura ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Com relação a  $\lambda$ , não foi observada correlação direta entre pH e temperatura para este parâmetro. Apenas nota-se que a elevação da temperatura de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para  $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  promoveu aumento da duração da fase lag de 4,85h  $3,24 * 10^{-7} \text{ h}$  e  $1,86 * 10^{-7} \text{ h}$ , em pH 5,5; 6,0 e 6,3, para 13,29h, 10,05h e 6,38h, respectivamente, ao mesmo tempo em que a elevação do pH em cada uma dessas temperaturas provocou diminuição da fase lag à medida que pH se aproxima da neutralidade.

Pode-se dizer que os valores de  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$  estimados pelos modelos primários de crescimento são considerados válidos, já que, para todas as condições de cultivo e para os dois modelos testados, apresentaram  $R^2$  bem

próximos de 1 e EQM próximos a zero (Tabela 2). Isso significa dizer que os dados experimentais de crescimento de *B. thermosphacta* se ajustaram bem às curvas de Baranyi e Roberts e Gompertz modificado e os valores preditos encontram-se próximos dos observados. De maneira geral, o modelo de Baranyi e Roberts apresentou ajuste discretamente melhor aos dados experimentais.

Uma vez validadas, as equações primárias obtidas (Tabela 3) podem ser utilizadas para predição de crescimento de *B. thermosphacta* em caldo de carne, nas condições de cultivo testadas.

### 3.2 Modelagem secundária do crescimento de *Brochothrix thermosphacta* em caldo de carne

Na Tabela 4 observam-se os modelos secundários gerados para modelar efeito da temperatura e do pH na taxa específica de crescimento máxima. Para *B. thermosphacta*, verificou-se, em condições experimentais, que pH 4,0 e temperatura 0 °C são considerados valores mínimos para o crescimento deste micro-organismo.

Tabela 4 Equações modelos secundários para *B.thermosphacta*

Modelo primário	Modelo secundário da raiz quadrada
Baranyi e Roberts	$\mu_{\max}=4,61577*10^{-5}[(T-(-10,977245))]^2*(pH- 1,5099520)$
Gompertz	$\mu_{\max} = 0,0000367[(T -(-11,7047))]2* (pH - 1,567511)$

Utilizaram-se os métodos estatístico e gráfico para validação dos modelos secundários de crescimento de *B. thermosphacta* em caldo de carne.

Pelo método estatístico foram obtidos os valores para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o erro médio quadrático (EMQ), o fator bias e o fator exatidão. Esses parâmetros calculados para os modelos secundários gerados a partir dos primários Baranyi e Roberts e Gompertz modificado estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 Parâmetros estatísticos,  $R^2$ , EQM, fator bias e fator exatidão, para validação da modelagem secundária de *B. thermosphacta*

Modelos	$R^2$	EQM	Fator bias	Fator exatidão
1	0,9323	0,0136	0,9982	1,3845
2	0,8630	0,0175	0,9971	1,0799

1 modelo da raiz quadrada gerado a partir modelo de Baranyi e Roberts, 2 modelo da raiz quadrada gerado a partir modelo de Gompertz modificado

Outro tipo de validação utilizado para facilitar a interpretação de quão confiável é uso de determinado modelo na predição microbiana é a construção do gráfico de erro percentual relativo (ER). Assim, tem-se a ideia da amplitude da zona na qual varia esse erro, como pode ser visto na Figura 1.

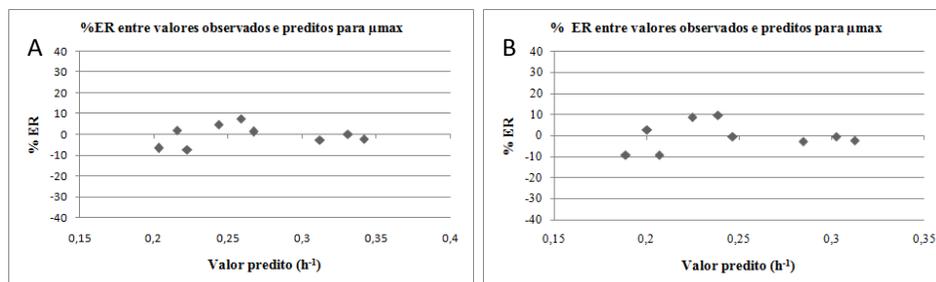


Figura 1 Erro percentual relativo (ER) entre valores observados e valores preditos para  $\mu_{\max}$  de *B. thermosphacta*. A: modelo secundário gerado a partir de Baranyi e Roberts, B: modelo secundário gerado a partir de Gompertz modificado

Obtidos os parâmetros de crescimento  $\lambda$  e  $\mu_{\max}$ , para se saber como os fatores pH e temperatura de armazenamento influenciaram estes parâmetros crescimento de *B. thermosphacta*, utilizou-se a modelagem secundária. Porém, como, em alguns casos, a fase lag foi muito pequena e, até mesmo suprimida, a modelagem secundária foi realizada apenas em relação ao parâmetro  $\mu_{\max}$ .

Assim, por meio das equações geradas por essa modelagem (Tabela 4), podem-se variar combinações de valores de temperatura e pH e estimar a taxa específica máxima com que crescerá *B. thermosphacta* em caldo ou carne ou em carne fresca, uma vez que o caldo de carne simula as condições nutricionais da carne fresca. Por exemplo, carne com pH inicial de 5,6 e armazenada a 4 °C, pelo modelo de Baranyi e Roberts, apresentará  $\mu_{\max}$  de  $0,04234\text{h}^{-1}$ . Já carne com pH inicial de 6,2 e armazenada a 9 °C apresentará  $\mu_{\max}$  de  $0,08639\text{h}^{-1}$ . Nota-se, por esses valores, que a elevação de pH e da temperatura impacta consideravelmente na elevação de  $\mu_{\max}$ .

Pela análise dos dados da Tabela 5, é possível notar que o modelo secundário gerado a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts apresenta bom ajuste modelo de Ratkowsky aos dados experimentais. Já o modelo gerado

a partir da modelagem de Gompertz modificado apresenta ajuste razoável, uma vez que quanto mais longe de 1 pior é o ajuste.

Quanto ao erro quadrado médio, ambos os modelos secundários apresentam erro baixo, 0,0136 e 0,0175, para Baranyi e Roberts e Gompertz modificado, respectivamente. Ainda assim, o modelo gerado a partir de Baranyi e Roberts apresentou melhor ajuste, devido ao fato de seu valor estar mais próximo de zero, demonstrando que, para este modelo, os dados preditos se aproximam mais dos dados experimentais do que para o modelo gerado a partir de Gompertz modificado.

O fator bias, outro parâmetro utilizado para a validação de modelos, estima a diferença média entre os valores observados e preditos, sendo que, quanto mais próximo de 1 melhor, pois, assim, a resposta predita será igual a observado. Para os dois modelos secundários gerados, o fator bias teve bom desempenho e, em ambos os casos, este valor foi menor que 1, o que significa dizer que os modelos falham na zona segura, ou seja, os valores preditos são menores que os observados. Mas, ainda assim, o modelo gerado a partir de Baranyi e Roberts apresentou melhor fator bias.

Por fim, o cálculo do fator exatidão utilizado com a intenção de avaliar a porcentagem de erro da previsão revela menor erro de previsão, desta vez para o modelo secundário gerado a partir da modelagem primária de Gompertz modificado, já que o fator exatidão para este modelo foi mais próximo a 1.

Pela análise visual das curvas da Figura 1, nota-se uma porcentagem de erro relativo bem semelhante para os modelos secundários. Eles variaram em uma margem de, praticamente, 10%, podendo, então, ser ambos considerados seguros para a predição do crescimento de *B. thermosphacta* em carne fresca.

Portanto, considerando os parâmetros estatísticos e a validação gráfica, o modelo secundário de Ratkowsky para avaliação da influência dos fatores pH e temperatura de incubação no crescimento de *B. thermosphacta* obtidos a partir

de dados gerados pelo modelo primário de Baranyi e Roberts apresenta ligeira vantagem quanto à validação das equações secundárias geradas.

#### 4 CONCLUSÃO

A modelagem do crescimento de *B. thermosphacta* em caldo de carne apresentou bom ajuste das curvas dos modelos primários aos dados experimentais e baixo desvio entre valores observados e valores preditos, podendo, então, ser utilizada para predição do crescimento de *B. thermosphacta* nas mesmas condições testadas. Notou-se que a alteração do pH não impactou tanto nos parâmetros de crescimento como a alteração da temperatura.

Quando se analisou o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento, notou-se que a elevação da temperatura ocasionou a elevação de  $\mu_{\max}$ , para ambos os modelos testados e o maior  $\lambda$ , foi obtido na temperatura de 7 °C, observando-se uma queda brusca deste parâmetro quando a temperatura subiu para 12 °C.

Já a análise conjunta do efeito do pH e da temperatura revela que à medida que se eleva o pH e a temperatura, aumenta-se  $\mu_{\max}$ , isso a 12 °C e, de maneira geral, pode-se dizer que, à medida que estes parâmetros se elevam concomitantemente, observa-se uma diminuição de  $\lambda$ .

Por fim, os modelos secundários gerados apresentaram bons índices estatísticos ( $R^2$ , EQM, fator bias e fator exatidão) para ambos os modelos primários que os geraram, o que os torna validados, para estimativa de  $\mu_{\max}$  de *B. thermosphacta*, quando variam a temperatura e o pH.

## REFERÊNCIAS

COUVERT, O. et al. Validation of a stochastic modelling approach for *Listeria monocytogenes* growth in refrigerated foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, p. 236–242, 2010.

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Food Society for Applied Bacteriology Symposium Series**, v. 21, p. 103-114, 1992.

ERCOLINI, D. et al. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 1990-2001, Apr. 2009.

JUNEJA, V. K.; MARKS, H. M.; HUANG, L. Growth and heat resistance kinetic variation among various isolates of Salmonella and its application to risk assessment. **Risk Analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis**, New York, v. 23, p. 199 –213, 2003.

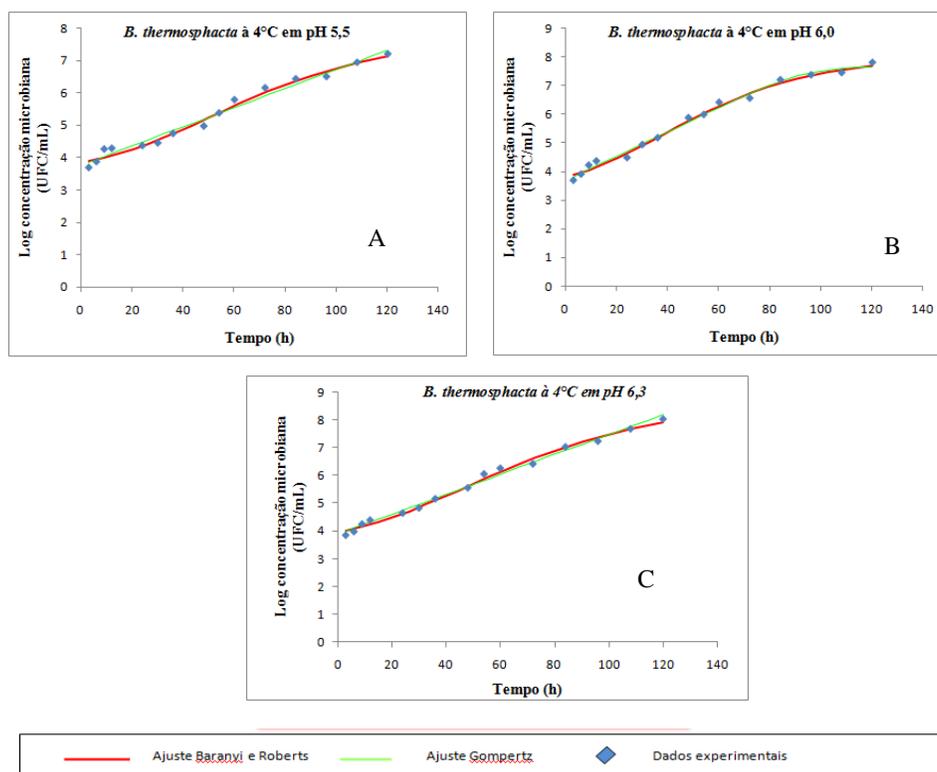
NOWAK, A.; PIOTROWSKA, M. Biochemical activities of *Brochothrix thermosphacta*. **Meat Science**, Barking, v. 90, n. 2, p. 410-413, Feb. 2012.

NYCHAS, G. E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, Jan. 2008.

PIN, C. et al. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4441–4447, Sept. 2002.

SAMAPUNDO, S. et al. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 35-52, July 2005

## APÊNDICE

APÊNDICE A- Curvas da modelagem primária do crescimento de *B. thermosphacta* nos diferentes valores de temperaturas e pH testadosFigura 1 Modelagem primária do crescimento de *B. thermosphacta* a 4 °C, em pH 5,5 (A), em pH 6,0 (B) e em pH 6,3 (C)

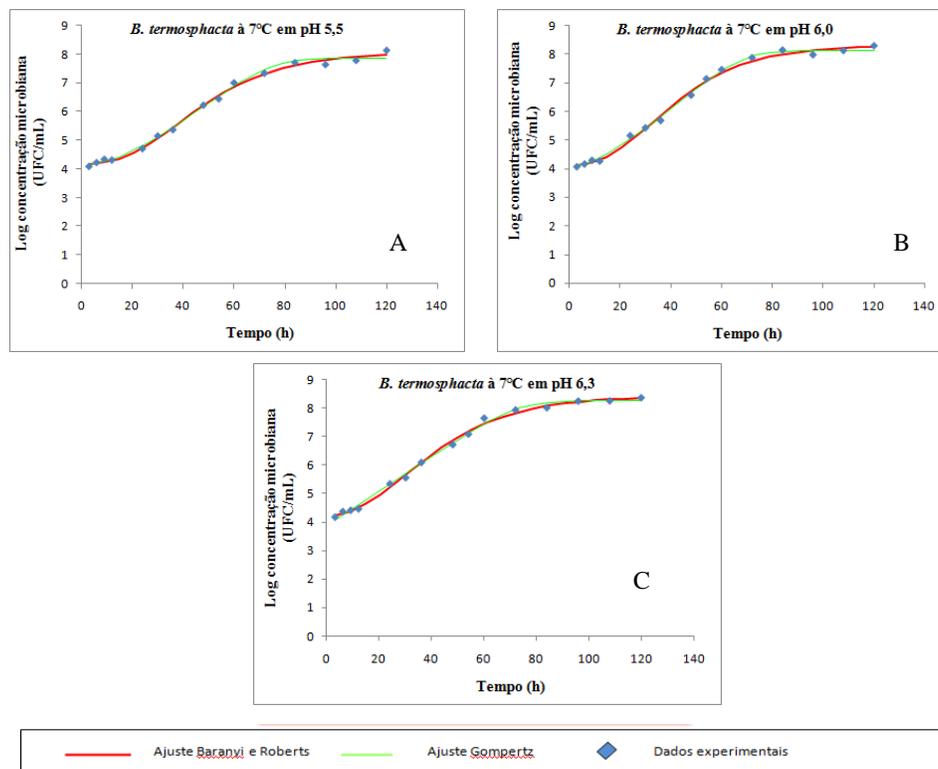


Figura 2 Modelagem primária do crescimento de *B. thermosphacta* a 7 °C, em pH 5,5 (A), em pH 6,0 (B) e em pH 6,3 (C)

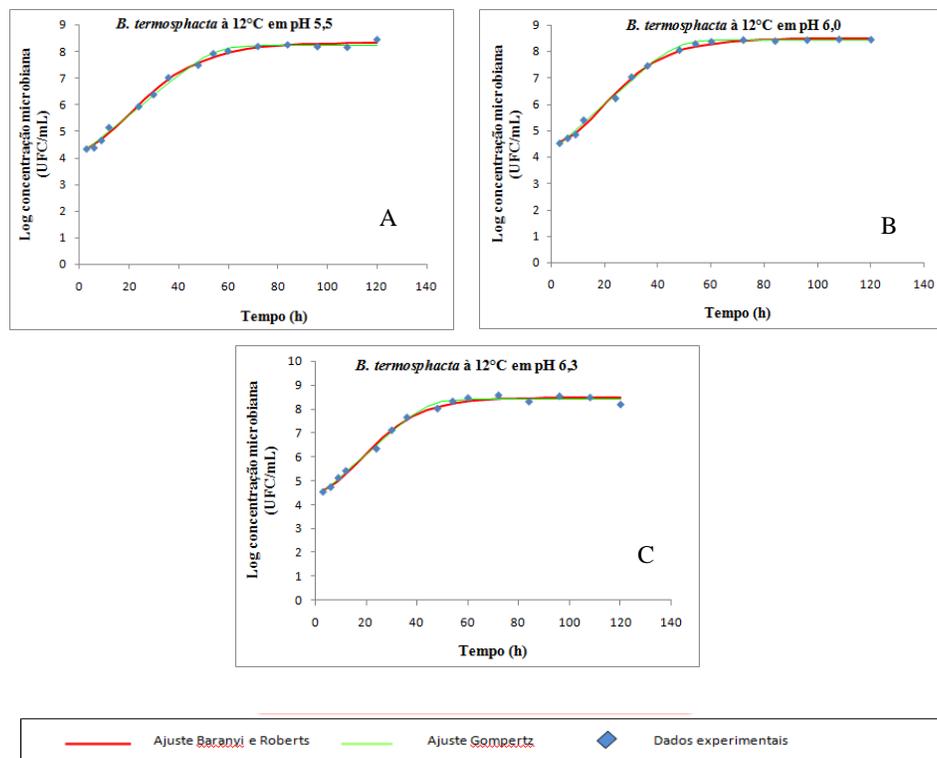


Figura 3 Modelagem primária do crescimento de *B. thermosphacta*, a 12 °C, em pH 5,5 (A), em pH 6,0 (B) e em pH 6,3 (C)