



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos

**Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação
de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco
de laranja e maçã**

Wilmer Edgard Luera Peña
(M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pilar Rodriguez de Massaguer

**Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor
em Ciência de Alimentos**

Campinas - Junho - 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

L967u	<p>Luera Peña, Wilmer Edgard</p> <p>Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em suco de laranja e maçã / Wilmer Edgard Luera Peña. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.</p> <p>Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>. 2. Microbiologia preditiva. 3. Suco de laranja. 4. Suco de maçã. 5. Nisina. 6. Pasteurização. I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(cars/fea)</p>
-------	--

Título em inglês: Use of predictive models for growth and inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange and apple juices

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Predictive microbiology, Orange juice, Apple juice, Nisin, Pasteurization

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

Ana Maria Frattini Fileti

Ivana Cristina Spolidorio Mc Knight

Antonio Sergio Ferraudó

Flavio Schmidt

Gilson Paulo Manfio

Dissertação de Doutorado defendida por Wilmer Edgard Luera Peña

Aprovada em de Junho de 2005 pela banca examinadora constituída pelos

Doutores:

Prof^a. Dr^a. Pilar Rodriguez de Massaguer
(Orientadora – FEA/UNICAMP)

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Frattini Fileti
(Membro – FEQ/UNICAMP)

Prof^a. Dr^a. Ivana Cristina Spolidório Mc Knight
(Membro – FEAU/UNIMEP)

Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraudo
(Membro – FCAV/UNESP)

Prof. Dr. Flavio Schmidt

(Membro – ITAL)

Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio
(Membro – NATURA INOVAÇÃO)

*A Dios, mayor don de la vida,
por permitirme conseguir esta nueva victoria.*

*A mi amada Helena por su cariño y amor sincero,
incentivándome siempre a seguir adelante, por su paciencia
y espera durante todos estos largos años.*

*A mis padres Humberto y Paulina, que desde Chimbote-
Perú, comprendieron y me apoyaron en esta caminata
brindándome cariño y enseñanzas.*

*A mis hermanos Emilio, Haydee y Erly que desde Santiago-
Chile, me dieron siempre su incondicional apoyo y por
supuesto a Gerson el menor de todos nosotros.*

Dedico!!

LOS HERALDOS NEGROS

Hay golpes en la vida, tan fuertes... Yo no sé!
Golpes como del odio de Dios; como si ante ellos,
la resaca de todo lo sufrido
se empozara en el alma... Yo no sé!

Son pocos; pero son... Abren zanjas oscuras
en el rostro más fiero y en el lomo más fuerte.
Serán talvez los potros de bárbaros atilas;
o los heraldos negros que nos manda la Muerte.

Son las caídas hondas de los Cristos del alma,
de alguna fe adorable que el Destino blasfema.
Esos golpes sangrientos son las crepitaciones
de algún pan que en la puerta del horno se nos quema

Y el hombre... Pobre... pobre! Vuelve los ojos, como
cuando por sobre el hombro nos llama una palmada;
vuelve los ojos locos, y todo lo vivido
se empoza, como charco de culpa, en la mirada.

Hay golpes en la vida, tan fuertes... Yo no sé!

César Vallejo (Poeta peruano)

Agradecimentos

Ao Departamento de Ciência de Alimentos/FEA – Unicamp pela acolhida

À Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação, apoio, amizade e os múltiplos ensinamentos acadêmicos.

Aos membros da Banca examinadora pelas sugestões e correções: Profa. Ana Maria Frattini, Profa. Ivana Spolidório, Prof. Flavio Schmidt, Prof. Antonio Sergio Ferraudo e Prof. Gilson Manfio.

Aos colegas e companheiros do Laboratório de Termobacteriologia Wilson, Sal, Cristiana, Alessandra Reyes, Alessandra Regina, André, Jónas, Ana Claudia, Anderson e a Rosinha (ex-técnica do Laboratório) sempre disposta a nos ajudar.

Agradecimento especial a Cristiana pela ajuda nas correções do português.

À minha família pela força recebida.

Aos amigos Harold, Delia, Liz e Luz pela amizade, que mesmo longe de casa compartilhamos grandes momentos inesquecíveis.

Ao Abraham, Milton e Edwin, amigos, que mesmo estando longe, torceram para que este empreendimento desse certo.

Ao Leandro pela amizade e pelo apoio.

À Fapesp pela bolsa concedida

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho

Enfim aos amigos que não foram citados, mas que estão gravados para sempre em minha mente e no meu coração.

Índice Geral

	Página
Resumo geral.....	xxi
Summary.....	xxiv
Introdução geral.....	1
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica.....	7
Parte 1: Microbiologia de sucos de frutas, <i>Alicyclobacillus</i> e preservação.....	8
1.1. Microbiologia de sucos de frutas ácidas.....	8
1.2. O gênero <i>Alicyclobacillus</i>	9
1.2.1. <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	11
1.2.2. <i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	12
1.2.3. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	12
1.3. Ocorrência de bactérias termoacidofilas em produtos ácidos.....	13
1.4. Resistência térmica de esporos bacterianos.....	16
1.4.1. Resistência térmica de <i>Alicyclobacillus</i>	18
1.5. Controle de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> – Nisina.....	23
1.6. A nisina	25
1.6.1. Estrutura.....	26
1.6.2. Propriedades físicas e químicas.....	27
1.6.3. Atividade antimicrobiana.....	28
1.6.4. Aplicações da nisina como coadjuvante térmico.....	30
1.7. Referências Bibliográficas.....	31
Parte 2: Microbiologia Preditiva de Alimentos.....	42
2.1. Histórico.....	42
2.2. Desenvolvimento de modelos preditivos.....	45
2.2.1. Identificação dos fatores a serem controlados.....	46
2.2.2. Inóculo.....	47
2.2.3. Meios experimentais.....	48
2.2.4. Planejamento experimental.....	48
2.2.5. Coleta de dados.....	49
2.2.6. Modelagem matemática e validação de modelos preditivos.....	51
2.2.6.1. Nível primário.....	52
2.2.6.2. Nível secundário.....	53
2.2.6.3. Nível terciário.....	54
2.2.6.4. Validação matemática.....	56
2.3. Estudo de modelos.....	59
2.3.1. Modelos de cinética e morte microbiana.....	59
2.3.2. Modelo de Gompertz.....	62
2.3.3. Modelo de Baranyi e Roberts.....	63
2.3.4. Modelo de superfície de resposta.....	68
2.3.5. Modelagem Probabilística de regressão logística.....	69
2.3.6. Modelagem por Redes Neurais Artificiais.....	73
2.3.6.1. Fundamentos e relações biológicas.....	75
2.3.6.2. Componentes de um nodo.....	76
2.3.6.3. Algoritmos de treinamento.....	78
2.3.7. Modelos para descrever o efeito da temperatura	81
2.3.7.1. Modelos tipo Bélehrádek.....	81

2.3.7.2. Modelos tipo Arrhenius.....	82
2.3.7.3. Modelo tipo Davey.....	82
2.3.7.4. Modelos para inativação e sobrevivencia.....	83
2.4. Referências Bibliográficas.....	84
Parte 3: Estruturação dos resultados em artigos científicos.....	94
Capitulo 2: Modelagem da interface do crescimento/não-crescimento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> cra7152 em suco de laranja como função do pH, temperatura, brix e concentração de nisina.....	96
Resumo.....	98
1. Introdução.....	100
2. Material e métodos.....	103
2.1. Cepa bacteriana e meios de cultura.....	103
2.2. Preparação da suspensão de esporos.	103
2.3. Matéria prima.....	104
2.4. Determinação máxima da concentração de nisina a ser utilizada no experimento.....	105
2.5. Planejamento experimental.....	106
2.6. Avaliação do crescimento e não crescimento.....	107
2.7. Modelo Probabilístico de Regressão logística.....	107
3. Resultados e Discussão.....	109
3.1. Caracterização microbiológica da matéria prima.....	109
3.2. Concentração máxima de nisina para inibição do <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em suco de laranja.....	109
3.3. Crescimento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA7152 em suco de laranja.....	110
3.4. Modelagem probabilística.....	112
4. Conclusão.....	119
Agradecimentos.....	119
Referências bibliográficas.....	120
Capitulo 3: Modelagem do crescimento e tempo de adaptação do <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja.....	145
Resumo.....	147
Introdução.....	147
Material e Métodos.....	149
Cepa bacteriana e meios de cultura.....	149
Preparação da suspensão de esporos.....	150
Planejamento experimental.....	151
Análise dos dados de crescimento.....	152
Função de Baranyi e Roberts.....	152
Função de Gompertz modificado.....	153
Modelo polinomial de superfície de resposta.....	154
Resultados e Discussão.....	154
Modelagem do crescimento via modelos primários.....	154
Modelagem do tempo de adaptação via modelo quadrático.....	159
Agradecimentos.....	164
Referencias bibliográfica.....	164
Capitulo 4: Influência da nisina na resistência térmica de esporos de	

	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA7152 em suco concentrado de laranja.....	193
	Resumo.....	195
	Introdução.....	196
	Material e métodos.....	198
	Cepa bacteriana e meios de cultura.....	198
	Preparação da suspensão de esporos.....	199
	Estudo da resistência termoquímica.....	200
	Planejamento experimental.....	200
	Avaliação dos dados e geração do modelo quadrático.....	202
	Resultados e Discussão.....	202
	Determinação do valor D e z de <i>A. acidoterrestris</i> em suco concentrado de laranja.....	202
	Determinação da concentração máxima de nisina.....	204
	Análise dos resultados via modelo quadrático.....	208
	Agradecimentos.....	213
	Revisão bibliográfica.....	213
Capítulo 5:	Modelagem do limite de crescimento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA7152 em suco de maçã: efeito do pH, Brix, temperatura e concentração de nisina.....	252
	Resumo.....	254
	Introdução.....	255
	Material e Métodos.....	257
	Cepa bacteriana e meios de cultura.....	257
	Preparação da suspensão de esporos.....	257
	Determinação da máxima concentração de nisina a ser utilizada no experimento.....	258
	Planejamento experimental.....	259
	Avaliação do crescimento e não crescimento.....	260
	Modelo probabilístico de regressão logística.....	260
	Resultados e discussão.....	262
	Determinação da maior concentração de nisina a ser utilizada... Crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA7152 em suco de maçã... Modelagem probabilística.....	262
	Crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA7152 em suco de maçã... Modelagem probabilística.....	263
	Modelagem probabilística.....	265
	Conclusões.....	270
	Agradecimentos.....	271
	Referencias bibliográficas.....	271
Capítulo 6:	Uso de redes neurais artificiais na modelagem da viabilidade do <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA7152 em suco de maçã.....	289
	Resumo.....	291
	Introdução.....	292
	Material e Métodos.....	294
	Cepa bacteriana e meios de cultura.....	294
	Preparação da suspensão de esporos.....	294
	Planejamento experimental.....	295
	Medida do crescimento.....	296
	Modelagem.....	296

Modelo polinomial quadrático.....	296
Modelo empírico de redes neurais artificiais (RNA).....	297
Critério de convergência.....	299
Critérios de comparação.....	300
Resultados e Discussão.....	301
Modelos preditivos.....	303
Modelo polinomial quadrático.....	303
Modelo neural.....	304
Comparação estatística entre o modelo polinomial de segunda ordem e o modelo neural.....	305
Agradecimentos.....	310
Referencias bibliográficas.....	310
Conclusão geral.....	336
Anexos:.....	339
Anexos Capítulo 3.....	340
Anexos Capítulo 4.....	344
Anexos Capítulo 6.....	359

Índice de Tabelas

		Página
Capítulo 1:		
Tabela 1.1. Espécies do gênero <i>Alicyclobacillus</i>		11
Tabela 1.2. Resistência térmica de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> ...		22
Capítulo 2:		
Tabela 1. Planejamento experimental composto central para crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja....		134
Tabela 2. Características do suco concentrado de laranja.....		135
Tabela 3. Respostas de crescimento e não crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 para as condições experimentais da Tabela 1.....		136
Tabela 4. Variáveis significativas para o modelo probabilístico.....		137
Tabela 5. Porcentagem de dados correto ajustado pelo modelo.....		138
Tabela 6. Probabilidades de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja a pH 3,0 e diferentes valores de T, °Brix e concentração de Nisina.....		139
Tabela 7. Probabilidades de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja a pH 3,5 e diferentes valores de T, °Brix e concentração de Nisina.....		140
Tabela 8. Probabilidades de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja a pH 3,7 e diferentes valores de T, °Brix e concentração de Nisina.....		141
Tabela 9. pH crítico predito com $p=0,05$ do <i>A. acidoterrestris</i> CRAA 7152 em suco de laranja.....		142
Tabela 10. Temperatura crítica predita com $p=0,05$ do <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de Laranja.....		143
Tabela 11. Concentração de nisina crítica para crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 a $p=0,05$ em suco de laranja.....		144
Capítulo 3:		
Tabela 1. Planejamento fatorial fracionário para crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152.....		179
Tabela 2. Parâmetros de crescimento do <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 calculados pelos modelos de Baranyi & Roberts e Gompertz.		180
Tabela 3. Tempo de adaptação utilizados para o modelo quadrático.....		181
Tabela 4. Coeficientes de regressão significativos.....		182
Tabela 5. Quadro de análise de variância para o modelo da equação 4.....		183
Capítulo 4:		
Tabela 1. Planejamento fatorial para estudo da termoresistencia de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152.....		218
Tabela 2. Porcentagem de redução do valor D a 95°C a diferentes concentrações de nisina em suco concentrado de laranja.....		219
Tabela 3. Efeito da temperatura de aquecimento e da adição de nisina na porcentagem de reduções do valor D de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68		

e 64°Brix.....	220
Tabela 4. Coeficientes de regressão significativos.....	221
Capítulo 5:	
Tabela 1. Respostas de crescimento e não crescimento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA7152 em suco maçã.....	276
Tabela 2. Variáveis significativas para construção do modelo.....	277
Tabela 3. Classificação dos valores observados e preditos usando modelo logístico para crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maçã (16 dias).....	278
Tabela 4. Probabilidades de crescimento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em suco de maçã 11°Brix.....	279
Tabela 5. pH crítico predito com $p=0,05$ do <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maçã.....	280
Tabela 6. Temperatura crítica predita com $p=0,05$ do <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maçã.....	281
Tabela 7. Concentração de nisina crítica para crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> a $p=0,05$ em suco de maçã.....	282
Capítulo 6:	
Tabela 1. Crescimento e viabilidade de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de maçã.....	315
Tabela 2. Coeficientes de regressão significativos.....	316
Tabela 3. Matriz de pesos e bias da camada intermediária.....	317
Tabela 4. Matriz de pesos e bias da camada de saída.....	318
Tabela 5. Resultados dos dados de validação.....	319
Tabela 6. Comparação estatística de redes neurais como o modelo quadrático.....	320

Índice de Figuras

	Página
Capítulo 1:	
Figura 1.1. Estrutura da nisina (DELVES-BROUGHTON, 1990).....	27
Figura 1.2 Inibição da fase de entumescimento de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> pela nisina (DELVES-BROUGHTON, 1990).....	29
Figura 2.1. Curva padrão do crescimento bacteriano a temperatura constante.....	50
Figura 2.2. Curva de crescimento de <i>Aeromonas hydrophila</i> modelados pela equação de Gompertz.....	53
Figura 2.3. Influência da temperatura e concentração de sal no tempo mínimo para produção de toxina por <i>Clostridium botulinum</i>	53
Figura 2.4. Interação de informação de neurônio biológico e sua analogia com o artificial.....	76
Capítulo 2:	
Figura 1. Efeito inibitório da nisina sobre o <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja 11,5 ^o Brix e pH 4 a 43 ^o C.....	126
Figura 2. Probabilidade de crescimento do <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja como função da temperatura de incubação e Brix: pH 3,7. (a) 0 nisina, (b) 50IU nisina.....	129
Figura 3. Probabilidade de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja como função do ^o Brix e concentração de Nisina: pH 3,7. (a) 20°C, (b) 30°C.....	132
Capítulo 3:	
Figura 1. Curvas e dados de Crescimento para os ensaios correspondentes aos pontos axiais e ponto central: (*) numero de ensaio; (21) pH, 4,4, 37°C, concentração de nisina, 0IU/ml, 15 ^o Brix; (20) pH, 5,8, 37°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 15 ^o Brix; (25) pH, 4,4, 37°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 15 ^o Brix; (23) pH, 4,4, 37°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 19 ^o Brix; (22) pH, 4,4, 37°C, concentração de nisina, 70IU/ml, 15 ^o Brix; (24) pH, 4,4, 37°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 19 ^o Brix ; (19) pH, 3, 37°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 15 ^o Brix; (18) pH, 4,4, 54°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 15 ^o Brix.....	184
Figura 2. Curvas de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja: 13 ^o Brix e 45,5 ^o C; (*) numero de ensaio; (4) pH=5,1, concentração de nisina 17,5 IU/ml, (8) pH=5,1, concentração de nisina 52,5 IU/ml, (2) pH=3,7, [] nisina 17,5 IU/ml e (6) pH=3,7 concentração de nisina 52,5IU/ml.....	185
Figura 3. Curvas de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA	

7152 em suco de laranja: 17°Brix e 45,5°C: (*) número de ensaio; (10) pH, 3,7 concentração de nisina 17,1IU/ml; (12) pH, 5,1 concentração de nisina 17,1IU/ml; (16) pH, 5,1 concentração de nisina 52,5IU/ml; (14) pH, 3,7 concentração de nisina 52,5IU/ml.....	186
Figura 4. Curvas e dados de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 a diferentes valores de pH, Brix e concentração de nisina incubados a 28,5°C: (◆) pH, 5,1, concentração de nisina 17,5, 13°Brix; (■) pH, 5,1, concentração de nisina 17,5, 17°Brix; (×) pH, 3,7, concentração de nisina 17,5, 13°Brix; () pH, 3,7, concentração de nisina 52,5, 13°Brix; (*) pH, 5,1, concentração de nisina 52,5, 13°Brix; (O) pH, 3,7, concentração de nisina 17,5, 17°Brix; (◇) pH, 3,7, concentração de nisina 52,5, 17°Brix; (Δ) pH, 5,1, concentração de nisina 52,5, 17°Brix.....	187
Figura 5. Histograma de efeitos significativos no tempo de adaptação de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja.....	188
Figura 6. Gráfico de Pareto para avaliar o efeito dos parâmetros no tempo de adaptação do <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja.....	189
Figura 7. Valores observados vs valores preditos e resíduos relativos.....	190
Figura 8. Superfície de resposta para o tempo de adaptação: (a) °Brix vs Temperatura, pH 4,4, e concentração de Nisina 35IU/ml; (b) concentração de Nisina vs pH, °Brix 15 e Temperatura 37°C.....	191
Figura 9. Superfície de resposta para o tempo de adaptação: (a) Temperatura vs concentração de Nisina, pH 4,4, e °Brix 15; (b) Temperatura vs pH, °Brix 15, e concentração de Nisina 35 IU/ml.....	192
Capítulo 4:	
Figura 1. Curva de sobreviventes para <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco concentrado de laranja 64°Brix e pH 3,68, com r^2 : 0,9934; 0,9909; 0,9668 e 0,9879 para 92, 95, 98 e 102°C respectivamente.....	223
Figura 2. Valor z para <i>A. acidoterrestris</i> CRA7152 em suco concentrado de laranja, pH 3,68 e 64°Brix, $r^2=0,9977$	226
Figura 3. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 a 92°C em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix. r^2 de 0,9934, 0,9872, 0,9701 e 0,9892 para 0, 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.....	229
Figura 4. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de <i>A. cidoterrestris</i> CRA 7152 a 95°C pH 3,68 e 64°Brix. r^2 de	

0,9909, 0,9943, 0,9849 e 0,9873 para 0, 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.....	232
Figura 5. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 a 98°C pH 3,68 e 64°Brix. r^2 de 0,9668, 0,9866, 0,9865 e 0,9868 para 0, 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.....	235
Figura 6. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 a 102°C pH 3,68 e 64°Brix. r^2 de 0,9960, 0,9860, 0,9960 e 0,9879 para 100, 75, 50 e 0IU/ml de nisina respectivamente.....	238
Figura 7. Efeito da nisina no valor z do <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix. R^2 de 0,9979, 0,9957 e 0,9964 para 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.....	241
Figura 8. Gráfico de Pareto para avaliar o efeito dos parâmetros no valor D do <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix.....	244
Figura 9. Efeito da temperatura e concentração de nisina no valor D de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix.....	247
Figura 10. (a) Valores observados vs valores preditos e (b) erro relativo nas predições do modelo.....	250
Capítulo 5:	
Figura 1. Efeito inibitório da nisina sobre o <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maçã 11°Brix, pH 4 e 43°C.....	284
Figura 2. Probabilidade de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maçã: Brix vs Temperatura; Nisina 0IU/mL, (a) pH=3,7, (b) pH=4,5.....	286
Figura 3. Probabilidade de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maçã: Brix vs Concentração de nisina:pH=4,0: (a) 45°C, (b) 30°C.....	288
Capítulo 6:	
Figura 1. Superfície de resposta no crescimento e inibição de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de maçã incubado a 35°C com adição de nisina de (a) 30IU/ml e (b) 70IU/ml....	322
Figura 2. Comparação da quantidade de parâmetros totais da rede com o número de parâmetros afetivos a partir da variação da quantidade de neurônios da camada escondida	325
Figura 3. Estrutura neural de previsão do Log(Nf)/Log(No) de <i>A. acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de maçã. (w_{ij} =pesos para a camada escondida), v_i (pesos para a camada de saída).....	328
Figura 4. Comparação das predições e resíduos de RNA e do modelo quadrático na implementação dos modelos.....	331
Figura 5. Comparação das predições e resíduos de RNA e do modelo quadrático na validação dos modelos.....	334

Nomenclatura geral

Capítulo 1:

DPA: ácido dipocolínico;

D: Índice de redução decimal a temperatura constante (min);

TDT: tempo de destruição térmica;

z: coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial (°C);

Aw: atividade de água;

Eh: potencial de óxido-redução;

μ : velocidade de crescimento microbiano;

λ : tempo de duração da fase lag (unidades de tempo);

κ : densidade populacional;

n: número de dados ou observações;

P: valor predito;

O: valor observado;

Brix: concentração de sólidos solúveis (% m/m);

Lt: Log_{10} da contagem microbiana;

A: valor da assíntota do Log_{10} (N);

N: número de unidades de formadoras de colônia;

M: tempo na qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima;

B: velocidade de crescimento relativa no tempo M;

GT: tempo de geração (h);

y_0 : população inicial no tempo zero;

Y(Max): população máxima;

SSE: somatório dos erros quadrados;
SSW: somatório do quadrado dos pesos e bias;
k: taxa de crescimento;
R: constante geral dos gases ($8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$);
S: fração de sobreviventes (x/x_0) no tempo t;
f: fração de sobreviventes da subpopulação 1;
(1-f): fração de sobreviventes da subpopulação 2;
 β_1 : taxa de morte específica da subpopulação 1;
 β_2 : taxa de morte específica da subpopulação 2;
 τ : medida de atraso térmico de inativação;
x: população no tempo t.

Capítulo 2:

Brix: concentração de sólidos solúveis (%m/m);
IU: Unidades internacionais;
P(x): probabilidade de crescimento/não-crescimento;
T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$);
g(x): transformação logit de P(x);
UFC/ml: unidades formadoras de colônia por ml.

Capítulo 3:

R²: coeficiente de determinação;

Brix: concentração de sólidos solúveis (%m/m);

IU: Unidades internacionais;

P(x): probabilidade de crescimento/não-crescimento;

T: temperatura (°C);

λ : tempo de adaptação ou duração da fase lag (unidade de tempo);

μ_{\max} : taxa de crescimento máxima;

α_0 : estado fisiológico da célula no tempo zero;

y_0 : população inicial;

$y(t)$: \log_{10} da população microbiana no tempo t;

n: parâmetro relativo a curvatura depois da fase lag;

m: parâmetro relativo a curvatura depois da fase exponencial;

a: $\log_{10} (N_0)$;

c: $\log(N-N_0)$;

t: tempo;

M: tempo na qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima.

Capítulo 4:

R^2 : coeficiente de determinação;

Brix: concentração de sólidos solúveis (%m/m);

IU: Unidades internacionais;

D: Índice de redução decimal a temperatura constante (min);

TDT: tempo de destruição térmica;

z: coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial (°C);

X_1 : temperatura ($^{\circ}\text{C}$);

X_2 : concentração de nisina (IU/ml);

Y: valor D (min);

x_p : valor predito;

x_o : valor observado;

F: tempo de processo;

$D_{102^{\circ}\text{C}}$: valor D a 102°C ;

γ : reduções decimais.

Capítulo 5:

Brix: concentração de sólidos solúveis (%m/m);

IU: Unidades internacionais;

$P(x)$: probabilidade de crescimento/não-crescimento;

T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$);

$g(x)$: transformação logit de $P(x)$;

UFC/ml: unidades formadoras de colônia por ml.

N_i : concentração de nisina (IU/ml).

Capítulo 6:

Y: $\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_o)$;

T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$);

N_i : concentração de nisina (IU/ml);

F: função objetivo;

SSE: somatório dos erros quadrados;

SSW: somatório do quadrado dos pesos e bias;

b : limiar interno “bias”;

w : pesos;

μ_{obs} : valor de saída observada;

μ_{pred} : valor de saída predita;

O: observado;

P: predito;

n : número de observações;

N : número de parâmetros totais da rede;

γ : número de parâmetros efetivos.

Resumo Geral

A presente pesquisa desenvolveu modelos preditivos de crescimento e/ou inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em sucos de laranja e maçã. Foram estudados os efeitos do pH, temperatura de incubação (T), concentração de sólidos solúveis (°Brix) e de nisina no crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em sucos concentrados de laranja e maçã e, o efeito da concentração de nisina e da temperatura de pasteurização na resistência térmica dos seus esporos em suco concentrado de laranja. Dois modelos primários, de Gompertz modificado e de Baranyi & Roberts, foram usados para descrever as curvas de crescimento da bactéria em suco de laranja. Verificou-se que o modelo de Baranyi & Roberts foi o mais adequado para descrever as respostas microbianas. Um modelo polinomial de segunda ordem de superfície de resposta descreveu o tempo de adaptação do microrganismo sob efeitos da temperatura, pH, concentração de nisina e °Brix em suco concentrado de laranja, com R^2 de 0,816. Mostrou-se que as combinações (28,5°C; pH 3,7; 17,5IU/ml de nisina e 17°Brix); (4 5,5°C; pH 3,7; 52,5IU/ml de nisina e 17°Brix) e (28,5°C; pH 5,1; 52,5IU/ml de n isina e 17°Brix) apresentaram o maior tempo de adaptação de pelo menos 47 dias de incubação.

O modelo probabilístico de regressão logística (capítulo 2 e 5), mostrou-se como uma importante ferramenta para descrição da região de interface cresce/não. Resultados importantes foram obtidos por estes modelos tanto para suco de laranja como de maçã. Foi confirmada que o uso da nisina é uma alternativa importante na prevenção do crescimento do *A. acidoterrestris*. Os parâmetros pH, temperatura e nisina assim como a interação Brix*temperatura foram significativos

representando 96% das respostas corretas dos dados experimentais em suco de laranja. Para o suco de maçã, 97% das respostas corretas dos dados experimentais foram representados pelos seguintes parâmetros e interações do modelo probabilístico: pH, temperatura, Brix, concentração de nisina, Brix*pH, Brix*temperatura e Brix*nisina.

O modelo quadrático, que descreveu a resistência termoquímica do *A. acidoterrestris* em suco concentrado de laranja, mostrou um bom ajuste com um R^2 de 0,995 e indicou que a resistência do microrganismo foi mais afetada pela ação da temperatura de pasteurização do que pela concentração de nisina. As variáveis, temperatura de pasteurização e concentração de nisina no nível linear e a temperatura no nível quadrático foram significativas. Assim, a nisina é mais uma opção na diminuição da resistência térmica dos esporos desta bactéria. Com uma concentração de 100 IU de nisina/ml de suco foram obtidas uma redução no valor D (tempo de redução decimal) de 29% a 92°C, 26% a 95°C, 23% a 98 °C e 21% a 102°C.

O uso alternativo da técnica de redes neurais artificiais (RNA), mediante o software Matlab v.6.5, foi contrastado com o modelo quadrático no estudo da determinação da viabilidade e crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de maçã de 11 a 19 °Brix. Os resultados experimentais mostram que 70 IU de nisina/ml foram suficientes para inibir o crescimento do *A. acidoterrestris* em qualquer condição testada (pH de 3,5 a 5,5; temperatura 25 a 50°C; e Brix de 11 a 19). A rede com quatro neurônios na camada escondida foi a que melhor se ajustou ao processo estudado. Os valores dos índices estatísticos para validação dos

modelos apresentaram Porcentagem média residual relativa – MRPR e Resíduo relativo médio absoluto – MARR de -17,43 e 17,81 para o modelo polinomial e, -1,67 e 14,54 para o modelo neural, respectivamente, mostrando que a performance do RNA foi levemente superior ao modelo polinomial. Assim, esta técnica pode ser explorada no campo da modelagem do crescimento e viabilidade microbiana.

Summary

This research developed predictive models of growth and/or inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange and apple juices. The effect of pH, incubation temperature (T), soluble solid (°Brix) and nisin concentration for *A. acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange and apple concentrated juices had been studied. Besides, nisin concentration and pasteurization temperature effect in the thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange concentrated juice was studied. Two primary models, of growth modified Gompertz modified and Baranyi & Roberts were used to describe growth curves of *A. acidoterrestris* in orange juice. It was verified that Baranyi & Roberts' model adjusted better to experimental data. A second order polynomial model (response surface) was used to describe the time of adaptation of microorganism under effect of the temperature, pH, soluble solids (°Brix) and nisin concentration. This mathematical expression fitted the experimental data with R^2 of 0,816. The was showed that the combinations (28,5°C; pH 3,7; 17,5IU/ml of nisin and 17°Brix), (45,5°C; pH 3,7; 52,5IU/ml of nisin and 17°Brix) and (28,5°C; pH 5,1; 52,5IU/ml of nisin and 17°Brix) in this order were better to obtain the highest adaptation time of at least 47 days.

The probabilistic model of logistic regression was used in (chapter 2 and 5). This model showed as an important tool to describe the interface regions growth/ no growth. Important results were obtained by these models for orange juice and apple, evidencing the use of nisin as an alternative to avoid *A. acidoterrestris* growth. The parameters pH, temperature, nisin and Brix*temperature were statistically significant, with overall correct predictions of 96% to orange juice. For

apple juice, the parameters and interactions (pH, temperature, Brix, concentration of nisin, Brix*pH, Brix*temperature and Brix*nisin) were significant.

The quadratic model used to describe the heat resistance of *A. acidoterrestris* in concentrated orange juice, showed good fitted, with R^2 of 0,995 and indicated that a resistance of microorganism was more affected by the temperature followed by nisin concentration. The pasteurization temperature and nisin concentration (linear level) and temperature (quadratic level). This indicated that nisin is an interesting option to reduce the thermal resistance of spores of this bacterium. In a concentration of 100IU of nisin/ml of juice, were obtained reduction of 29%, 26%, 23% and 21% of value D (Decimal reduction time) for temperatures of 92, 95, 98 and 102°C respectively.

The alternative use an of artificial neural networks technique (RNA) using Matlab software v.6.5 was contrasted with the quadratic model in the study of the viability and growth determination of *A. acidoterrestris* in apple juice (11 to 19°Brix). The experimental results showed that 70IU of nisin/ml were enough to inhibit the growth of bacterial to any tested condition (pH of 3,5 to 5,5; temperature 25 to 50°C and Brix of 11 to 19).

A network with four neurons in the hidden layer was best adjusted to the studied process. The values of the statistical indices for validation of the models: Mean relative percentage residual (MRPR) and mean absolute relative residual (MARR) were -17,43 and 17.81 for polynomial model and, -1,67 and 14,54 for the neural model respectively. They showed that the performance of RNA was lightly superior than that polynomial model, and this technique can be explored in the field of modeling microbial growth and viability.

Introdução Geral

Alicyclobacillus é atualmente um dos microrganismos de interesse da indústria de sucos de frutas. As características termotólicas e acidófilas desta bactéria conferem-lhe resistência ao processo de pasteurização do suco e, habilidade para produzir “off-flavor” pela geração de compostos fenólicos. Como atualmente já foi identificado e caracterizado, o principal interesse é prevenir o seu desenvolvimento em produtos ácidos. A detecção do microrganismo no concentrado torna-se importante, pois embora nessas condições a probabilidade de desenvolvimento seja praticamente nula, após reconstituição do suco os esporos do microrganismo podem germinar, crescer e deteriorar o produto quando estocado em condições favoráveis.

A citricultura é a segunda atividade rural em importância no Estado de São Paulo, perdendo apenas para a cana-de-açúcar. Segundo resultados obtidos através mapeamento desenvolvido pelo PENSA-Programa de Estudos dos Negócios do Sistema Agroindustrial da Universidade de São Paulo (USP), com o apoio do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), o setor movimentou US\$ 3,23 bilhões em 2003 (FUNDECITRUS, 2005) sendo US\$ 1,3 bilhão em exportações de suco concentrado de laranja. O Brasil mantém a posição de maior produtor mundial de laranja, com uma área cultivada de 820 mil hectares, 77% dos quais encontram-se na região sudeste. Para o suco concentrado, as exportações passaram de 1.069,271t em 2002 para 1.284,861t em 2003 (ABECITRUS, 2005). O do suco de maçã, embora muito distante em números de produção da laranja, representa o segundo principal suco de exportação brasileira com 30.307t

exportadas, representado faturamento de 19.906 mil US\$ em 2004 (AGRICULTURA, 2005).

Na atualidade, a contaminação dos produtos ácidos, bem como a estabilidade durante a estocagem dos sucos de frutas pela presença de *A. acidoterrestris* é considerada um desafio para a indústria de sucos, já que o processo de aquecimento requerido para inativar esporos deste microrganismo é também apropriado para produzir mudanças organolépticas inaceitáveis para muitos produtos. Entretanto muitos esforços e estratégias devem ser feitos para prevenir o crescimento desse microrganismo. Dentro deste contexto o uso da nisina pode ser uma alternativa, dada suas características de estabilidade a altas temperaturas e pH ácido e de ação coadjuvante ao tratamento térmico na redução da resistência térmica dos esporos, bem como de componente de um sistema de múltipla barreira (pH, temperatura e concentração de sólidos solúveis) para evitar o desenvolvimento da bactéria. A análise do efeito deste sistema de múltiplas variáveis pode ser estudada via aplicação de procedimentos e modelos matemáticos preditivos. Segundo Hajmeer e outros (1997) esses modelos simulam o crescimento de diferentes tipos de microrganismos que causam deterioração nos alimentos. Os modelos gerados podem auxiliar na descrição da conduta de crescimento do microrganismo sobre o efeito dos fatores do meio, facilitar a predição da vida-de-prateleira do produto bem como ajudar a diferenciar e formular novos produtos e pesquisas sobre binômio tempo-temperatura. Estimar os níveis dos fatores do meio através de modelos matemáticos, pode ajudar a determinar os limites dos pontos críticos de controle do processo; esta aplicação é particularmente útil em situações onde há interação de vários fatores que

controlam o crescimento microbiano. Sem dúvida todos os parâmetros de crescimento e inativação de microrganismo tais como velocidade máxima de crescimento (μ), tempo de lag (λ), população máxima (κ), valor D e z, são bem estimados através dos modelos matemáticos preditivos; auxiliando não apenas em controle de qualidade, mas também em avaliação de riscos, análise de dados e planejamento laboratorial.

No suco industrializado tratado termicamente o *Alicyclobacillus* dificilmente teria competidores, pois as bactérias lácticas e as leveduras que estão presentes em altas concentrações da matéria prima são eliminadas e o *Alicyclobacillus* não. Por outro lado esta bactéria se encontra na forma de esporo, resistindo portanto as condições de processo.

Por outro lado, certamente que os modelos seriam afetados em níveis de inóculo diferente, principalmente no que se refere ao tempo de adaptação, levando isto em conta foi usado inóculo comumente encontrado em sucos concentrados que é da ordem de 10^2 ufc/ml. O efeito do inóculo inicial pode ser analisado em futuras modelagens

Não existem modelos preditivos de crescimento ou de inativação em sucos de frutas para *Alicyclobacillus* na literatura. Desta forma esta pesquisa se torna relevante levando em conta a importância econômica destes produtos no âmbito Brasileiro.

Os objetivos desta pesquisa foram:

- Estudar o efeito dos fatores pH, temperatura, concentração de nisina e sólidos solúveis (°Brix), no crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de laranja e maçã mediante enfoque probabilístico;
- Modelar os efeitos dos fatores, antes mencionados no tempo de adaptação da bactéria em suco de laranja utilizando modelo de superfície de resposta;
- Modelar a inativação termoquímica de esporos de *A. acidoterrestris* em suco concentrado de laranja sob ação da temperatura de pasteurização e concentração de nisina;
- Estudar o uso de redes neurais artificiais como alternativa na modelagem da viabilidade e crescimento do *A. acidoterrestris* em suco de maçã.

Para tanto, a faixa do pH, concentração de sólidos solúveis (°Brix) e temperatura foram fixados levando em consideração a faixa de crescimento do *A. acidoterrestris*. Por outro lado a faixa de concentração de nisina utilizada foi escolhida através de testes preliminares, segundo as sugestões de Komitopoulou et al (1999) para determinação de concentração de nisina máxima.

Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS – ABECITRUS, Exportações, série histórica. www.abecitrus.com.br, 2005.

EGUCHI, S.Y.; CANHOS, V.P. Sub Projeto 5: Diversidade de bactérias de importância agroindustrial Sub-projeto 5 : Diversidade de Bactérias de Importância Agroindustrial – www.bdt.fat.org.br/bacteria/subprojeto5, 2001.

EIROA, M.N.V.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SCHMIDT, F. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. **Journal of food protection**, v.62, n.8, p.883-886, 1999.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA-Fundecitrus. Informativo “Divulgado o novo mapeamento do sistema agroindustrial citrícola”. www.fundecitrus.com.br/informativo/nota_mapcadeia0404.html, 2005.

HAJMEER, M.H.; BASHEER, L.A.; NAJJAR, Y.M. Computational neural networks for predictive microbiology: II. Application to microbial growth. **International journal of food microbiology**, v.34, p.51-66, 1997.

JENSEN, N.; WHITFIELD, F.B. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint shelf-stable fruit juice. **Letters in Applied microbiology**, v.36, p.9-14, 2003.

KOMITOPOULOU, E., BOZIARIS, I.S., DAVIES, E.A., DELVES-BROUGHTON, J., ADAMS, M.R..*Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *J. Food Sci. and Technol*, 34, 81–85. 1999

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de produção e comercialização. Exportações Brasileiras de Sucos de Frutas. www.agricultura.gov.br, 2005.

ORR, R.V.; SHEWFELT, R.L.; HUANG, J.C.; TEFERA, S. BEUCHAT, L.R. Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by

sensory and chromatographic analyses and comparison with spore and vegetative cell populations, **Journal of food protection**, v.63, n.11, p.1517-1522, 2000.

PINHATTI, M.E.M.C.; VARIANE, S.; EGUICHI, S.V.; MANFIO, G.P. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. **Fruit processing**, v.9, p.350-353, 1997.

PONTIUS, A.J.; RUSHING, J.E.; FOEGEDING, P.M. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. **Journal of food protection**, v.16, n.1, p.41-46, 1998.

WISOTZKEY, J.D., JURTSCHUK, P., FOX, G.E., DEINHARD, G., PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal System Bacteriology**, v.42, p.263-269, 1992.

Capítulo 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Parte 1: Microbiologia de sucos de frutas, *Alicyclobacillus* e preservação

1.1. Microbiologia de sucos de frutas ácidas

Os sucos de frutas ácidas com valores de pH inferior a 4,0 são considerados tradicionalmente como alimentos que inibem o desenvolvimento da maioria das bactérias (HERSON; HULLAND, 1980). As propriedades destes produtos são responsáveis pela eliminação da grande maioria dos microrganismos patogênicos que podem contaminar o produto. Entretanto, os sucos de frutas são um substrato apropriado para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, particularmente bactérias esporuladas e fungos, capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos aplicados, podendo crescer a baixos pHs. Estes microrganismos podem estimular a deterioração do produto pela degradação de alguns de seus componentes como carboidratos, proteínas e vitaminas, produzindo odores e sabores indesejáveis e mudanças na cor, pH e textura do produto final (EGUCHI et al., 2001a).

Sucos de frutas concentrados (ao redor de 66ºBrix) estocados sob refrigeração inibem a ação deteriorativa. Apesar disso depois de reconstituídos com água (ao redor de 11ºBrix), tornam-se susceptíveis a contaminação por microrganismos deteriorantes (EGUCHI et al., 2001a). Embora o tratamento térmico aplicado a estes produtos reconstituídos seja eficiente contra a maioria das células vegetativas, as formas dormentes (esporos) de algumas bactérias e fungos são resistentes e podem encontrar no suco simples, ambiente favorável para germinar e crescer, que sob certas condições deterioram o produto.

Até final da década de 80 o crescimento de microrganismos em sucos cítricos estava bem documentado resultando na produção de “off-flavour” e outros

produtos de contaminação (PARISH, 1991). A microflora é limitada, apresentando apenas bactérias acidotolerantes, leveduras e bolores, sendo que a maioria das bactérias acidotolerantes constituem os *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (PARISH; HIGGINS, 1988). Deste modo, os sucos de frutas foram considerados durante muito tempo como produtos, apenas passíveis de deterioração por leveduras, bolores e bactérias lácticas.

A probabilidade de contaminação por microrganismos de baixa resistência térmica permitiu que as indústrias de sucos usassem um aquecimento suficiente para um processo seguro de pasteurização, conferindo-lhes, assim, uma esterilidade comercial (MCINTYRE et al., 1995). Contudo, os sucos de frutas são substratos adequados para o desenvolvimento de microrganismos esporulados capazes de sobreviver a tratamentos térmicos de pasteurização e de crescer em pH baixo, especialmente bactérias (EIROA, 1984).

Atualmente o gênero *Alicyclobacillus* envolve várias espécies: *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidium*, *A. sendaiensis*, *A. acidophilus* e *A. herbarius*, dentre todas estas espécies, o *A. acidoterrestris* está sendo considerado como indicador microbiológico na qualidade de sucos.

1.2. O gênero *Alicyclobacillus*

Bactérias acidófilas formadoras de esporos foram inicialmente isoladas, em 1967, de fontes termais no Japão (UCHINO; DOI, 1967). A faixa de pH encontrada para crescimento foi de 2,3 a 5,0 com temperaturas entre 45 a 71°C. Baseados em características morfológicas, estes microrganismos foram originalmente classificados como *Bacillus coagulans* com crescimento a 55°C e pH 4,2 (WALLS;

CHUYATE, 1998). Organismos similares também foram isolados por Darland e Brock em 1971, de fontes termais nos Estados Unidos, com faixa de crescimento de pH entre 2 a 6 com temperaturas entre 45 a 70°C. Baseados na sua composição de base de DNA, estes microrganismos não foram mais classificados como *Bacillus coagulans* e passaram a ser considerados como uma nova espécie. Os autores propuseram o nome de *Bacillus acidocaldarius* (WALLS; CHUYATE, 1998).

Em 1981, um microrganismo acidófilo formador de esporo foi isolado de solo (HIPPOCHEN, 1981), mostrando-se diferente ao *Bacillus acidocaldarius*, quanto a sua temperatura de crescimento, caracterização bioquímica e composição de base de DNA. O pH de crescimento foi de 2 a 5 a temperaturas entre 22 a 62°C, com células formando endósporos terminais e subterminais (WALLS; CHUYATE, 1998). Depois de um estudo de caracterização destes microrganismos Deinhard e outros (1987a) propuseram um novo nome, *Bacillus acidoterrestris*.

Em 1992, Wisotzkey e outros, baseados em resultados de análise comparativa de seqüências de RNA ribossomal 16S e perfis da composição de ácido graxo propuseram a criação de um novo gênero *Alicyclobacillus* para um grupo de 3 bactérias: *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* e *A. cycloheptanicus*. Esses autores descreveram como principal característica destes microrganismos a presença de ácidos graxos ω -alicíclico em sua membrana lipídica, que segundo PONTIUS et al. (1998) contribui para sua sobrevivência a baixos níveis de pH e altas temperaturas. A Tabela 1.1 apresenta as características gerais de algumas das espécies pertencentes a este gênero:

Tabela 1.1. Espécies do gênero *Alicyclobacillus*

Características	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. cycloheptanicus</i>
Ácido graxo ω -cyclohexil C ₁₇ e C ₁₉	+	+	- Ácidos graxo ω -cycloheptil C ₁₈ e C ₂₀
Necessidades de fatores para crescimento	-	-	+ Vitamina B12, isoleucina.
Formação de ácido a partir de eritritol	+	-	Não detectado
pH de crescimento	2,2 – 5,8	2,0 – 6,0	3,0 – 5,5
Temperatura de crescimento (°C)	20 - 55	45 – 70	40 – 53

Fonte: Baumgart e Menje (2000)

1.2.1. *Alicyclobacillus acidocaldarius* (DARLAND; BROCK, 1971)

São bastonetes aeróbios gram positivos, formadores de endósporos, com 2 a 3 μ m de comprimento e 0,7 a 0,8 μ m de largura. O esporângio não é entumescido. Os endósporos terminais ou subterminais são haplóides, possuindo elevada resistência ao calor. As colônias são planas com bordas irregulares não pigmentadas. O ácido graxo predominante na membrana é o ω -cyclohexil. Sendo que o ω -cyclohexil-undecanoico (ω -C:17) e o ω -cyclohexil-tridecanoico (ω -C:19) contribuem com o 50% do total de ácidos graxos. A faixa de pH e temperatura de crescimento está indicada na Tabela 1.1.

1.2.2. *Alicyclobacillus cycloheptanicus* (DEINHARD et al., 1987b)

São bastonetes aeróbios e geram positivos formadores de endósporos subterminais. O tamanho da célula é de 2,5 a 4,5µm de comprimento e 0,35 a 0,55µm de largura. Os esporos são ovais, com o esporângio levemente entumescido. As colônias são circulares, pequenas e requerem fatores para crescimento tais como metionina, isoleucina, vitamina B12. O principal ácido graxo da sua membrana celular é o ácido graxo ω-cycloheptil-undecanoico, ω-cycloheptil-tridecanoico e o ácido ω-cycloheptil-α-hidroxi-undecanoico. A faixa de pH e temperatura de crescimento está indicada na Tabela 1.1.

1.2.3. *Alicyclobacillus acidoterrestris*

São aeróbios gram positivos, bastonetes formadores de endósporos terminais ou subterminais, variando de 2,9 a 4,3µm de comprimento e 0,6 a 0,8µm de largura. Os esporos são ovais. As colônias são circulares, creme-claras, opacas a translúcidas. Não requerem nenhum fator de crescimento. A temperatura ótima de crescimento está em torno de 42 a 53°C, porém algumas cepas podem ser mais mesófilas com temperaturas ótimas ao redor de 37°C. A faixa de temperatura para crescimento depende da cepa e do meio assim temos que Previdi e outros (1995) reportaram crescimento entre 25°C a 60°C; Yamasaki (1996) a 35 a 55°C; Pettipher e outros (1997) a 25 a 44°C e Walls e Chuyate (1998) a 20 a 55°C. A faixa de temperatura para germinação dos esporos foi reportada entre 26 a 50°C (CERNY et al., 1984) e entre 42 a 53°C (DEINHARD et al., 1987a). Os esporos do *Alicyclobacillus acidoterrestris* apresentam alta resistência quando expostos a

meios ácidos com temperaturas de pasteurização comumente aplicadas a sucos de frutas e vegetais. Diversas faixas de pH para crescimento foram reportadas: 2,5 a 5,5 (CERNY et al., 1984); 2,5 a 5,8 (DEINHARD et al., 1987a); 2,2 a 5,8 (YAMAZAKI, 1996) com faixa ótima entre 3,5 a 5,0 (PINHATTI et al., 1997).

1.3. Ocorrência de bactérias termoacidófilas em produtos ácidos

O primeiro relato de contaminação de suco de fruta causado por um microrganismo acidófilo formador de esporo ocorreu em suco de maçã (pH 3,15), empacotado assepticamente na Alemanha em 1982 (CERNY et al., 1984). O microrganismo deteriorante foi identificado inicialmente como *Bacillus acidoterrestris* e posteriormente reclassificado no novo gênero *Alicyclobacillus* (WISOTZKEY et al., 1992).

Entre 1984 a 1994 não houve registros de ocorrência de contaminação de sucos por este microrganismo. Mas em 1994 Splisttoesser e outros (1994) isolaram cepas de *bacillus* acidófilo em suco de maçã industrializado e envasado a quente. Os sucos apresentaram “off-flavor” sem formação de gás e leve turbidez. As cepas bacterianas isoladas mostraram características similares ao *Bacillus acidocaldarius* isolado por Darland e Brock (1971) em águas termais nos Estados Unidos. McIntyre e outros (1995) isolaram *bacillus* acidófilos esporulados de suco concentrado reconstituído e pasteurizado num sistema de enchimento a quente e da água utilizada no preparo desses sucos.

Previdi e outros (1995) caracterizaram cepas de bactéria esporulada acidófila isolada de suco de laranja não deteriorado, na Itália, que mostraram características similares com as de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

A contaminação dos produtos elaborados a base de frutas ácidas por *A. acidoterrestris* está associada com o desenvolvimento de odores e sabores não característicos medicinais ou anti-sépticos (MCINTYRE, 1995; WALLS; CHUYATE, 1998). A substância química responsável por esse “*flavor*” foi identificada como guaiacol (ORR *et al.*, 2000), de acordo com Pettipher e outros (1997), tal composto, a 2 ppb pode ser detectado por medições sensoriais em suco de frutas. Em suco de maçã e laranja foi detectado quando aproximadamente 10^5 células viáveis de *A. acidoterrestris*/ml estiveram presentes. Eguchi e outros (2001b) demonstraram através de análise sensorial pequena diferença em relação ao odor para níveis de 10^2 esporos/ml quando comparado com suco não inoculado, sendo mais intensa para níveis de 10^3 esporos/ml de inoculação de *Alicyclobacillus*. Aparentemente o guaiacol, é um composto ofensivo formado a partir da vanilina por atividade microbiana da bactéria. O guaiacol produz um cheiro desagradável sendo sinal de deterioração do suco de fruta (JENSEN, 2000). Outras substâncias atribuídas a contaminação por *Alicyclobacillus* são o 2,6-dibromo-fenol e 2,6-dicloro-fenol (JENSEN; WHITFIELD, 2003).

Embora as três espécies *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* e *A. cycloheptanicus*, sejam classificadas como pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus*, outras novas espécies também foram isoladas. Albuquerque e outros (2000) isolaram uma nova espécie de *Alicyclobacillus* do solo de Furnas na Ilha de São Miguel, no arquipélago de Azores. Este organismo apresentou temperatura ótima de crescimento de 50°C, com características fisiológicas e bioquímicas semelhantes

as do *A. acidoterrestris*, sendo o componente predominante da sua parede celular os ácidos alicíclicos ω -cyclohexil, e foi denominada como *A. hesperidum*.

Tsuruoka e outros (2003) isolaram também, do solo de Sendai no Japão, uma bactéria com temperatura de crescimento entre 40 a 65°C com valor ótimo de 55°C e pH de crescimento entre 2,5 a 6,5, sendo o ótimo de 5,5. Depois de uma análise de seqüência de rDNA 16S o microrganismo mostrou similaridade com o gênero de *Alicyclobacillus*. Sendo o maior constituinte da sua membrana celular o ácido graxo ω -alícíclico. Entretanto o estudo de reassociação DNA-DNA mostrou baixa similaridade (menor que 33%) quando comparado com qualquer espécie de *Alicyclobacillus*. A nova espécie proposta foi denominada de *A. sendaiensis*.

Matsubara; Goto e Matsumura (2002) também isolaram uma nova espécie de *Alicyclobacillus*, a partir de bebidas ácidas com deterioração e odor característico de guaiacol, denominando-a de *A. acidophilus*. A espécie encontrada tem como componente predominante na parede celular ácido alicíclico ω -cyclohexil, sendo seu conteúdo de G + C de 54,1%.

Outra nova espécie foi proposta por Goto e outros (2002), *A. herbarius* sp.nov. isolada de chá feito de flores de hibiscus provenientes do Japão. As análises de seqüência de 16S rRNA mostraram que esta bactéria foi diferente de espécies previamente descritas como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, mas contém ácido graxo ω -cycloheptil na membrana lipídica similar ao *A. cycloheptanicus*, porém fenotípicamente diferente.

No Brasil, Pinhatti e outros (1997) quantificaram *Alicyclobacillus* em amostras de concentrado de laranja em até $1,8 \times 10^2$ UFC/ml. Por outro lado Eiroa e outros

(1999) detectaram 14,7% de ocorrência de *Alicyclobacillus* em suco concentrado de laranja em um total de 75 amostras analisadas. Recentemente Mc knight (2003) indicou a presença de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em 28% das 57 amostras de suco de maracujá comercial analisadas, sendo que a contaminação variou de 1,1 e >23 NMP/100ml. Já segundo Mc Knight (2003), em suco de abacaxi não foi evidenciada a presença desta bactéria.

1.4. Resistência térmica de esporos bacterianos

Um esporo pode ser descrito como o estado inativo ou dormente de um organismo. Neste estado há falta de atividade biosintética e a atividade respiratória é reduzida (GOMBAS, 1987).

A resistência térmica de esporos bacterianos depende da espécie, do meio e da temperatura na qual o esporo foi produzido. Durante a incubação de culturas para produção de esporos, a observação contínua por microscópio é importante para determinar quando deverá ser realizada a coleta dos mesmos. Uma incubação prolongada pode produzir esporos maduros com alta porcentagem de população celular. Porém em algumas espécies isto não é recomendado, pois pode ocorrer re-germinação (STUMBO, 1965). Os esporos contem ácido dipicolínico (DPA) o que não ocorre em células vegetativas e que aparece no início da esporulação. Sua associação com a formação do córtex sugere que o DPA localiza-se no córtex dentro do esporo (STUMBO, 1965). Durante o processo de germinação o DPA é completamente liberado e o cortex desaparece durante os primeiros minutos da germinação.

Coincidentemente com a formação do DPA existe uma incorporação de cálcio em concentrações superiores daquelas encontradas em células vegetativas (VINTER 1956). Isto já foi confirmado por outras pesquisas. Porém, ainda não se sabe se o cálcio é requerido nas reações de sínteses bioquímicas de DPA ou se é necessário na combinação com o produto final. A formação do DPA e a incorporação de cálcio estão relacionadas com o aumento da resistência do esporo ao calor, por outro lado a liberação de DPA e de cálcio durante a germinação é coincidente com a perda da resistência térmica (STUMBO, 1965).

Uma outra razão que causa a termoresistência é a desidratação do core que fornece ao esporo uma baixa atividade de água e que resulta na estabilidade das moléculas (GOMBAS, 1983).

A resistência térmica dos esporos pode ser afetada por tratamentos como a sonificação (SANZ et al., 1982) ou irradiação ionizante e acidificação, quando aplicados antes ou simultaneamente com o processo térmico. Uma seqüência de tratamentos pode também ser importante. Doses moderadas de radiação ionizante podem causar diminuição no valor D (tempo necessário para reduzir a população de esporos viáveis em 90% a uma dada temperatura), com subsequente aquecimento do esporo (GOMBAS; GOMES, 1978), e um tratamento conjunto de radiação e calor pode resultar em uma inativação sinérgica (PALLAS; HAMDY, 1976).

Os esporos geralmente manifestam baixo valor D quando são aquecidos sob condições ácidas, possivelmente por danos no DNA (SAKO et al., 1981). Esporos dormentes contêm relativamente altos níveis de cátions divalentes como cálcio, magnésio e manganês localizados na região do core que aumenta aparentemente

sua concentração, além dos limites normais de solubilidade. Estudos de condutividade mostraram que esses cátions encontram-se imobilizados no esporo dormente (CARSTENSEN; MARQUES; GERHARDT, 1971). Assim a manipulação da carga de cátions pode alterar a resistência do esporo. Depois de uma prolongada incubação a baixo pH os cátions são progressivamente eliminados do esporo, resultando em redução de sua resistência térmica; porém este fenômeno pode ser reversível com restauração parcial ou completa através de uma incubação prolongada com elevada concentração de sais e em pH alcalino (GOMBAS, 1983).

1.4.1. Resistência térmica de *Alicyclobacillus*

Determinar a resistência térmica do *Alicyclobacillus acidoterrestris* é muito importante para implementação de processos térmicos usados na preservação de sucos de frutas ácidas. Como mencionado anteriormente, a presença de ácido graxo com radical ω -cyclohexil, contribui para sua sobrevivência a altas temperaturas e baixos níveis de pH.

A partir dos primeiros relatos, desde 1984, foram realizadas análises da resistência térmica deste microrganismo. Splittstoesser, Churey e Lee (1994) relataram valores D a 85, 90 e 95°C de 56, 23 e 2,8min respectivamente. Os ensaios foram realizados em suco de maçã e o valor z (número de °C necessário para reduzir o valor D em um décimo) reportado foi de 7,7°C.

Yamazaki e outros (1997) estudaram a influência do meio de esporulação e íons divalentes na resistência térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Os autores submeteram os esporos a desmineralização e logo a remineralização com cálcio, mostrando que não houve diferença na resistência térmica das três formas de esporos obtidos (controle, desmineralizada e mineralizada com cálcio). Eles mostraram ainda que o conteúdo de Ca^{++} e Mn^{++} dos esporos foi pouco alterado, o que poderia significar a presença constante de íons divalentes que lhe fornece resistência térmica elevada.

Eiroa e outros (1999) determinaram resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja. Eles concluíram que o melhor tratamento para ativação dos esporos, em suco de laranja, foi a 70°C por 20min, sendo que os valores D encontrados foram: de 60,8 a 94,5min a 85°C; de 10,0 a 20,6min a 90°C e de 2,5 a 8,7min para 95°C. Os valores z reportados por estes autores ficaram entre 7,2 a 11,3°C. Os resultados mostraram alta resistência desses esporos, sendo capazes de sobreviver a tratamentos térmicos usuais aplicados no processamento de suco de laranja.

Splittstoesser, Lee e Churey (1998) estudaram o efeito de sólidos solúveis em suco de uva. Testaram 3 níveis de °Brix, 16, 30 e 65 e temperaturas de 85, 90 e 95°C. Seus resultados mostraram que a concentração de sólidos é diretamente proporcional à resistência térmica. Tal fato comprovou que seria mais difícil destruir os esporos em suco concentrado do que em suco simples pronto para beber.

O tipo de ácido (málico, cítrico, e taratárico) não afetou o valor D do *A. acidoterrestris* (PONTIUS; RUSHING; FOEGEDING, 1998), neste estudo foi usado meio laboratorial com valores de pH entre 2,8 a 4,0 e temperaturas de 88, 91, 94,

97 e 100°C. Os autores mostraram também que o efeito do pH foi observado apenas a baixas temperaturas.

Silva et al. (1999) estudaram o efeito do pH (2,5 a 6,0), sólidos solúveis totais (sst) 5 a 60°Brix e temperatura (85 a 97°C) no valor D de *A. acidoterrestris* usando metodologia de superfície de resposta. Os autores utilizaram meio laboratorial. Como esperado, a temperatura foi o fator que mais afetou a resistência térmica. O valor D aumentou linearmente com o aumento de sólidos solúveis totais e pH, especialmente a baixas temperaturas, porém a temperaturas próximas de 97°C o efeito destes fatores não foi evidenciado. Utilizando o modelo polinomial de superfície de resposta predições do valor D realizaram-se e, em muitos casos, foram menores do que os dados experimentais determinados no próprio alimento. Assim mudanças nos testes em produtos têm que ser realizados antes que essas predições sejam usadas na indústria.

Mc Knight (2003) estudou a resistência térmica de isolados de bactérias termoacidófilas, em suco de maracujá, com elevada similaridade genética ao *A. acidoterrestris* DSM 2498. Foram testados 87, 90 e 95°C com pH do suco de 3,5. Os valores D reportados foram: de 28,9 a 20,9 min a 87°C; de 8,0 a 4,2min a 90°C e de 1,8 a 2min para 95°C, sendo que o valor z variou de 7,02 a 7,13°C. Mostrou-se então que os processos usuais de pasteurização de suco de maracujá não são suficientes para destruir os esporos desta bactéria. Recentemente Tamega Jr (2005) estudou a cinética de destruição térmica de *A. acidoterrestris* DSM 2498 em suco de laranja, 11°Brix com pH de 3,4 a 3,7 em sistemas contínuos a temperaturas de 95, 98 e 102°C utilizando os métodos de Ponto equivalente e das Exposições isotérmicas equivalentes pareadas para determinação dos parâmetros

cinéticos. O autor encontrou que o valor D equivalente a 98°C ficou entre 0,23 a 0,85 do valor D em tubo TDT (thermal death time) para ambos os métodos utilizados e, que o valor do coeficiente térmico z para *A. acidoterrestris* DSM 2498 determinado em sistemas contínuos é aproximadamente o dobro encontrado para tubo TDT em suco simples de laranja. Mostrando-se a velocidade de morte menos dependente da temperatura.

Um resumo de valores D e z determinados em diferentes produtos de frutas mostra-se na Tabela 1.2. Observa-se a variabilidade destes parâmetros para os diferentes tipos de produtos.

Tabela 1.2. Resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris*

Médio de aquecimento	Cepa	pH	SS (°Brix)	T (°C)	D (Min)	z (°C)	Referência
Suco de maçã	VF	3,5	11,4	85	56	7,7	Splittstoesser et al. (1994)
				90	23		
				95	2,8		
Suco de uva	WAC	3,3	15,8	90	16	7,2	Splittstoesser et al. (1994)
				95	2,4		
				85	50		
				90	16,9		
				95	2,7		
Suco de laranja	DMS 2498	3,15	9	95	2,7	7,9	Eiroa et al. (1999)
Suco de toranja	CRA 7182	3,4	nr	80	39,7	1,6	Komitopoulou et al. (1999)
				90	5,95		
				95	1,85		
Extrato de cupuaçu	NCIMB 13137	3,6	11,3	85	17,5	9,0	Silva et al. (1999)
				91	5,35		
				95	2,82		
				97	0,57		
Suco de maracujá	DMS 2498	3,5	12	87	19,9	7,13	Mc Knight (2003)
				90	4,8		
				95	1,4		
Suco de laranja (Sistemas contínuos)	DMS 2498	3,5 -	11	95	0,66	(11,7	Tamega Jr (2005)
		3,7		98	0,61	-	
				102	0,19	19,5)	

nr = não reportado

1.5. Controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris* - Nisina

Vários são os estudos na literatura que relatam a prevenção do crescimento de *A. acidoterrestris*, usando ácidos orgânicos, preservantes, desinfecção da matéria prima e a aplicação de novas tecnologias.

Yamazaki e outros (1997a) examinando o efeito de vários ácidos orgânicos no crescimento de *A. acidoterrestris* encontraram que 0,1% de ácido ascórbico não causou inibição, sendo a população final tão alta quanto o controle. Quando foi usado ácido láctico, e succinico, ambas a 0,1%, houve inibição apenas nas primeiras 36 horas sendo que a maior inibição do crescimento observou-se com 0,1% de ácido acético. Estes resultados indicaram que produtos com conteúdo de ácido acético podem se manter estáveis e dificilmente serão contaminados por *Alicyclobacillus acidoterrestris*; entretanto outros produtos que não contenham este ácido poderão tolerar o seu crescimento.

Cerny e outros (2000) estudaram a influência da temperatura, potencial de oxido-redução e o conteúdo de oxigênio no crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de frutas. A 46°C o crescimento foi mais rápido do que a 35°C. A 30°C observou-se uma longa fase lag, prolongando-se quando estocados sob refrigeração por várias semanas. O efeito do potencial redox foi aplicado pela adição de ácido ascórbico, testado a 35°C. Com a adição de 10mg de ácido ascórbico o crescimento foi estimulado, entretanto a concentrações de 15mg o crescimento foi inibido. Em suco de laranja, 0,1% de oxigênio residual na embalagem foi suficiente para permitir o crescimento da bactéria, o mesmo não ocorreu em condições anaeróbias; já em suco de maçã, concentrações de oxigênio residual de 3 a 7%

permitiram rápido crescimento tanto quanto em condições atmosféricas (21% de oxigênio).

Pettipher e Osmundson (2000) mostraram o efeito de alguns preservantes e carbonatação no crescimento e sobrevivência de *A. acidoterrestris* em bebidas contendo 1, 2,5 ou 5% de suco de maçã e laranja, incubados a temperatura ambiente. Observaram um alto nível de células no controle depois de 10 dias. Quando foi adicionado ácido sórbico (300mg/ml), ácido benzóico (150mg/ml) ou uma combinação de ambos, a contaminação foi prevenida. A carbonatação do suco também preveniu o crescimento da bactéria.

Num outro estudo, Doyle (1999) reportou o efeito de vários desinfetantes sobre esporos de *A. acidoterrestris* expostos a 23°C durante 10 minutos, observando-se reduções logarítmicas de 0,4 a 2,4 com 1% de H₂O₂, 200 ppm Cl₂, e 500ppm de cloreto de sódio acidificado. A exposição para 8% de fosfato trisódico e 80 ppm de H₂O₂ em ácido peracético (Tsunami, Echo Laboratories) foi menos efetiva. Em superfícies de maçãs, 500ppm de Cl₂ e 1200ppm de cloreto de sódio acidificado resultaram em reduções de menos de 1 ciclo logarítmico. O tratamento com 2% H₂O₂ foi ineficiente para inativar esporos remanescentes da superfície das maçãs.

Inativação de células vegetativas de *A. acidoterrestris* por tratamento de alta pressão foi realizada por Alpas, Alma e Bozoglu (2003), conseguindo-se mais de 4 ciclos log de redução em suco de maçã, laranja e tomate, quando aplicado 350 MPa a 50°C por 20 min.

Embora os estudos relatados conseguiram reduzir a taxa de contaminação por *Alicyclobacillus* em produtos cítricos; outra alternativa como o uso da nisina pode ser investigada. Assim, o efeito inibitório sobre o crescimento e inibição desta

bactéria pode ser estudada, considerando-se que alguns estudos têm sido desenvolvidos, mostrando-a como coadjuvante ao tratamento térmico.

1.6. A nisina

A nisina foi descoberta na Inglaterra, em 1928, em experiências durante a fabricação de queijo. Notou-se que o crescimento de *Streptococci lacti* era inibido dentro de uma cultura “starter” do leite (*Lactobacillus bulgaricus*) (ROGERS, 1928). Alguns anos depois, problemas similares foram observados na Nova Zelândia (THOMAS; CLARKSON; DELVES-BROUGHTON, 2000). Ocasionalmente, os queijeiros experimentaram falha das culturas no leite dentro de um período de incubação de 18h, no entanto nenhum bacteriófago foi detectado. Isto acontecia somente quando, contrariamente a sua prática usual, os queijeiros não tinham usado o leite fresco, e sim, o leite que tinha sido armazenado durante a noite. Pensou-se então que as culturas queijeiras não estavam sendo afetadas adversamente por algum bacteriófago, mas sim por alguma substância protéica inibitória desconhecida que estaria presente no leite (WHITEHEAD, 1933; HUNTER; WHITEHEAD, 1944). O armazenamento do leite tinha permitido que algum microrganismo contaminante crescesse e produzisse o inibidor. A substância protéica foi isolada e testada durante a segunda guerra mundial, em um esforço não apenas para resolver os problemas da fabricação de queijos, mas também para explorar o potencial deste composto na medicina humana e veterinária (MEANWELL, 1943). Mattick e Hirsch (1947) caracterizaram o composto e chamaram-no, nisina, pertencente ao “Grupo **N** Inhibitory Substances” produzido por *Lactococcus lactis*. A nisina não é um antibiótico e sim

um peptídeo antimicrobiano. Diferenças importantes incluem o fato de que a nisina não persiste no corpo ou no ambiente, nem é associada com o desenvolvimento da resistência bacteriana (THOMAS; CLARKSON; DELVES-BROUGHTON, 2000). O uso da nisina como preservante em alimentos foi mostrado inicialmente em 1951, quando uma cultura que produziu nisina impediu a formação de gás e a conseqüente contaminação de queijo suíço por *Clostridium butyricum* (HIRSCH, 1951). A primeira preparação comercial de nisina (Nisaplin) foi realizada em 1953, pela Aplin Barrett Ltda, e em 1969 um comitê da FAO/WHO em aditivos de alimentos reconheceu a nisina como um preservativo de alimentos biológico seguro e legal (FAO/WHO, 1969).

1.6.1. Estrutura

A nisina, bacteriocina produzida por certas cepas de *Lactococcus lactis*, é um agente polipeptídico constituído de 34 aminoácidos com cinco ligações sulfídricas circulares (Figura 1.1). Estas ligações originam os aminoácidos Lantionina e beta-metil-lantionina. Possui também um grupo amino e outro carboxila. O peso total da molécula de nisina é de 3510 Daltons (DELVES-BROUGHTON, 1990). A estrutura molecular da nisina é muito semelhante à da bacteriocina subtilina. Esta subtilina apresenta também os aminoácidos lantionina e beta-metil-lantionina e, diferentemente da nisina, contém aminoácido triptofano. Estas duas bacteriocinas além da estrutura química tem modo de ação, utilização em alimentos e espectro antimicrobiano muito semelhante.



Figura 1.1. Estrutura da nisina (DELVES-BROUGHTON, 1990)

1.6.2. Propriedades físicas e químicas

A nisina é uma molécula catiônica, devido à combinação de três resíduos de lisina e mais um de histidina. É insolúvel em solventes não polares, sendo que sua solubilidade aumenta na água quando o pH é diminuído (ADAMS; SMID, 2003). Apresenta alta estabilidade sobre condições ácida sendo mais solúvel a pH baixo (HURST, 1981). A estabilidade ótima ocorre em torno de pH 3,0 com perdas da atividade de apenas 5% depois de aquecimento por 115°C/20 min. Na literatura, os níveis de atividade da nisina foram expressos de diversas maneiras diferentes baseadas em UI (Unidades Internacionais), em peso de nisina pura ou em peso da nisina comercial, Nisaplin[®]. A atividade da nisina pura é aproximadamente 4,0x10⁶UI/g. O Nisaplin tem uma atividade padrão de 1x10⁶UI/g, assim 1ug de Nisaplin é equivalente a 1UI (ADAMS; SMID, 2003)

As características atrativas deste conservante são: não é tóxico para seres humanos (ADAMS; SMID, 2003), conseqüentemente pode ser considerado como um preservativo natural de alimentos mantendo sua estabilidade como

antimicrobiano a altas temperaturas e pH baixo (3 a 4), sendo que seu efeito principal é sobre bactérias gram positivas formadoras de esporos (JAY, 1994). Evidentemente trata-se da microbicina mais universalmente usada para conservar alimentos, sendo que ao redor de 46 países permitem seu uso até certos limites (DELVES-BROUGHTON, 1990). Em termos práticos, a nisina é protegida pelos ingredientes do alimento e não será danificada por um processo de pasteurização ou de esterilização (HEINEMANN; VORIS; STUMBO, 1965). No Brasil é empregada em queijos fundidos e em preparados a base de queijos fundidos no limite de 12,5 mg/Kg.

As características naturais da nisina impulsionaram o interesse da indústria em estender seu uso além das áreas tradicionais. Assim, seu uso potencial seria parte de um sistema múltiplo de barreiras para preservação do alimento (GOULD, 2000).

1.6.3. Atividade antimicrobiana

A maioria das bactérias vegetativas gram positivas são inibidas e os endósporos bacterianos mostram uma sensibilidade marcada. Por outro lado, as bactérias gram negativas são mais resistentes, devido a sua membrana exterior protetora que exclui a passagem livre das moléculas de nisina que excedem 700 Daltons (ADAMS; SMID, 2003) sendo, conseqüentemente, incapaz de alcançar seu alvo de ação. Na célula vegetativa a nisina age na membrana citoplasmática, interage eletrostaticamente com os fosfolipídios da membrana para produzir poros não seletivos. O fluxo acelerado de íons, aminoácidos e de ATP através desses poros resulta no colapso e morte da célula (ADAMS; SMID, 2003).

O uso mais difundido da nisina é frente a esporos, porém os fenômenos bioquímicos desta atividade ainda não foram claramente elucidados. Seu efeito é normalmente esporostático realçado sob condições ácidas ou se os esporos forem injuriados termicamente. Já seu efeito esporocida foi relatado dependendo da severidade do tratamento térmico. A germinação do esporo pode não ser afetada, mas o crescimento pós-germinativo resulta ser inibido (HITCHENS; GOULD; HURST, 1963; GOULD, 1964). Para DELVES-BROUGHTON (1990a) a inibição dos esporos de *B. stearothermophilus* pela nisina se dá na fase de entumescimento (Figura 1.2)

Segundo Thomas, Clarkson e Delves-Broughton (2000) as espécies do gênero *Bacillus* e *Clostridium* são altamente sensíveis a nisina sendo que os esporos são mais do que as células vegetativas, principalmente aqueles que rompem sua membrana mecanicamente.

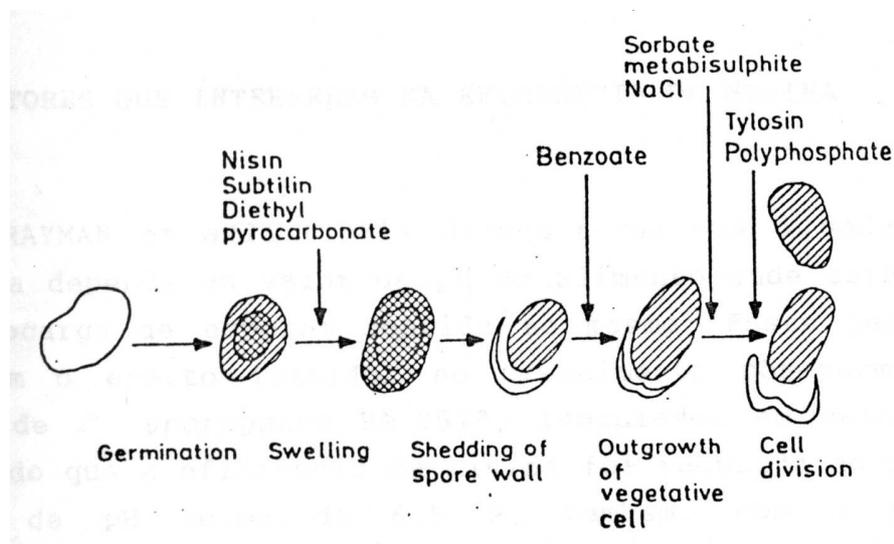


Figura 1.2 Inibição da fase de entumescimento de esporos de *B. stearothermophilus* pela nisina (DELVES-BROUGHTON, 1990).

1.6.4. Aplicações da nisina como coadjuvante térmico

Desde tempos remotos, tratamento térmico é o mais usado para inativar microrganismo relacionados com alimentos. Hoje em dia muitas aplicações utilizam a nisina como efeito aditivo ao calor, objetivando inibição dos esporos que sobreviveram ao processo térmico. Sua presença durante o aquecimento aumenta a letalidade dos processos aplicados.

Komitoupolou e outros (1999) reportaram descobertas de que a nisina e polipeptídios inibem o crescimento pós-germinativo. Eles encontraram que o efeito inibidor da nisina em *A. acidoterrestris* é muito dependente da temperatura. A 25^oC, 5IU de nisina/ml não permitiu o crescimento da bactéria em sucos de maçã e laranja (1 IU de nisina é ~1 µg de nisina comercial). A 44^oC, em ambos sucos, alguma germinação e crescimento ocorreu com 50IU de nisina/ml de suco. Entretanto ambos foram prevenidos com 100IU de nisina/ml de suco. Os autores também encontraram que a presença de nisina reduziu a resistência térmica desses esporos.

De acordo com Davis e outros (1998) a estabilidade da nisina não se vê afetada adversamente pelas temperaturas de pasteurização, aplicadas ao suco com pH na faixa de 3 a 4. Yamazaki e outros (2000) reportaram a sensibilidade do *A. acidoterrestris* frente a variadas concentrações de nisina: a pH 3,4 e 4,2 o MIC (concentração mínima de inibição) para células vegetativas foi de 1,56 – 25 IU/ml e 25 – 50 IU/ml, respectivamente. Os esporos foram mais sensíveis à nisina que as células vegetativas pois foram inibidos com <0,78 – 12,5 IU/ml e 25 – 100IU/ml a pH 3,4 e 4,2 respectivamente.

Observações similares foram realizadas em células vegetativas gram positivas. A nisina aumentou a sensibilidade ao calor de *Listeria monocytogenes* em carne, permitindo um processo mais brando e redução de perda do peso drenado (BUDU-AMOAKA et al., 1999). A nisina também pode atuar sinergisticamente com o calor a temperaturas entre 48 a 56°C contra *Lactobacillus plantarum* (UECKERT; STEEG; COLE, 1998).

O uso da nisina então resulta ser uma opção para o controle de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas, podendo ser testada como coadjuvante nos processos térmicos.

1.7. Referências Bibliográficas

1. ADAMS, M.; SMID, E. Nisin in multifactorial food preservation, chapter 2, In: Sibel Roller, **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**, CRC, Boston, 2003.
2. ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F.A.; CHUNG, A.P.; SUUA, A.; NOBRE, M.F.; GROTE, R.; ANTRANIKIAN, G.; COSTA, M.S. *Alicyclobacillus hesperidum* sp nov and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.50, p.451-457, 2000.
3. ALPAS, H.; ALMA, L.; BOZOGLU, F. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato-juices by high hydrostatic pressure. **World Journal of microbiology & biotechnology**, n.19, p.619-623, 2003.

4. BAUMGART, J.; MENJE, S. The impact of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on the quality of juices and soft drinks, **Fruit processing**, n.7, p.251-254, 2000.
5. BUDU-AMOAKA, E. ABLETT, R.F.; HARRIS, J.; DELVES-BROUGHTON, J. Combined effect of nisin and moderate heat on the destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. **Journal food protection**, v.62, p.46-50, 1999.
6. CARSTENSEN, E.L.; MARQUIS, R.E.; GERHARDT, P. Dielectric study of the physical state of electrolytes and water within *Bacillus cereus* spores, **Journal Bacteriology**, p.106-107, 1971.
7. CERNY, G.; DUONG, H.A.; WENNLICH, W.; MILLER, S. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. **Food Australia**, 52(7), p.289-291, 2000.
8. CERNY, G.; HENNLICH, W.; PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and characterization of the spoiling microorganism. **Z. Lebens. Unters. Forsch.** 179, p.224-227, 1984.
9. DARLAND, G.; BROCK, T.D. *Bacillus acidocaldarius* sp. Nov. an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium, **Journal Gen. microbial.** n.67, p.9-15, 1971.
10. DAVIS, E.A.; BORIS, H.E.; POTTER, R.; HARRIS, J.; WILLIAM, G.C.; DELVES – BROUGHTON, J. Research note: the effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. **Lett. Appl. microbial.** n.27: 186-187, 1998.
11. DEINHARD, G.; BLANZ, P.; PORALLA, K.; ALTAN, E. *Bacillus acidoterrestris* sp.nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soil. **Systematic and Applied microbiology**, n.10, p.47-53, 1987a.

12. DEINHARD, G.; SAAR, J.; KISCHE, W.; PORALLA, K. *Bacillus cycloheptanicus* sp. Nov. A new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids, **System applied microbial**. V.10, p.68-73, 1987.
13. DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative, **Journal of the society of dairy technology**, n.43, p.73-76, 1990a.
14. DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technol.** 44(11): 100-117, 1990.
15. DOYLE, M.P. Inactivation of *Alicyclobacillus* spores. At a glance newsletter. **Center for food safety & quality enhancement**, v.8, n.2 p.1, 1999.
16. EGUCHI, S.Y.; MANFIO, G.P.; PINHATTI, E.; AZUMA, E.; VARIANE, S.E. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice. Detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. Part.1 **Fruit Processing**, p.12-18, 2001a.
17. EGUCHI, S.Y.; MANFIO, G.P.; PINHATTI, E.; AZUMA, E.; VARIANE, S.E. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice. Detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. Part.II **Fruit Processing**, p.95-101, 2001b.
18. EIROA, M.N.V.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SCHMIDT, F.; *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores, **Journal of food protection**, v.62, n.8, p.883-886, 1999.
19. EIROA, M.N.V.; LEITON, M.E.F.; DAVENPORT, R.R.; CULLON, B.T. *Zygosaccharomyces bailli* em suco de frutas concentrados: estudo da

- ocorrência e avaliação da sua resistência ao calor e aos conservantes químicos, **Col. ITAL**, n.14, n.14, p.57-72, 1984.
20. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Specifications for identity and purity of some antibiotics, 12th report, **WHO technical report series**, No 430, 1969.
 21. GOMBAS, D.E. Bacterial spore resistance to heat, **Food Technology**, v.11, p.105-110, 1983.
 22. GOMBAS, D.E. Bacterial sporulation and germination, In. **Food Microbiology** v.1, Thomas y. Montville, CRC, Press, 1987. Cap. 5 p.131-155
 23. GOMBAS, D.E.; GOMES, R.F. Sensitization of *Clostridium perfringens* spores to heat by gamma radiation. **Appl. Environ. Microbiol**, v.36, p.403, 1978.
 24. GOTO, K.; MATSUBARA, H.; MOCHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus herbarius* sp.nov., A novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. **Int. Journal, of Syst. And Evol. Microb**, v.52, p.109-113, 2002.
 25. GOULD, G.W. Effect of food preservatives on the growth of bacteria from spores, (1964) In: THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin, In: **Natural food antimicrobial system** edited by Naidu, A.S. CRC press London, 2000. Cap. 18.
 26. GOULD, G.W. Strategies for food preservation In. **The Microbiological Safety and Quality of food**. B.M. Lund, A.C. Baird-Parker and G.W. Gould (eds), Aspen Publishers Inc. Gaithersburg p.19-35, 2000.

27. HEINNEMANN, B.; VORIS, L.; STUMBO, C.R. Use of nisin in processing food products. **Food Technol**, n.19, p.592-596, 1965.
28. HERSON, A.; HULLAND, E. Canned foods. Na Introduction to their microbiology. **Journal of Churchill**, London, 1980, 319p.
29. HIPPOCHEN, B.; ROLL, A.; PORALLA, K. Occurrence in soil of thermoacidophilic bacilli possessing co-cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Arch. Microbiol**, v.129, p.53-55, 1981.
30. HIRSCH, A. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*, **J. Gen. Microbiol**, n.5, p.208-221, 1951.
31. HITCHENS, A.D.; GOULD, G.W.; HURST, A. The swelling of bacterial spores during germination and outgrowth, **J. Gen. Microbiol**, n.30, p.455-453, 1963.
32. HUNTER, G.J.E.; WHITEHEAD, H.R. J. Dairy Res. 13, p.123, 1944 In: THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin, In: **Natural food antimicrobial system** edited by Naidu, A.S. CRC press London, 2000, Cap. 18
33. HURST, A. Nisin, *Adv Applied Microbiology*, v.27, p.85-123, 1981.
34. Jay, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**, Ed. Acribia, Zaragoza España, p.325-326, 1994.
35. JENSEN, N. *Alicyclobacillus* in Australia, **Food Australia**, v.52, n.7, p.282-285, 2000.
36. JENSEN, N.; WHITFIELD, F.B. Role of *Alicyclobacillos acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint shelf-stable fruit juice, **Letters in Applied microbiology**, v.36, p.9-14, 2003.

37. KOMITOPOULOU, E.; BOZIARIS, I.S.; DAVIES, E.A.; DELVES-BROUGHTON, J.; ADAMS, M.R. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. **J. Food Sci. and Technol**, n.34: 81 – 85, 1999.
38. MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T. *Alicyclobacillus acidophilus* sp.nov. A novel thermo-acidophilic, ω -alicyclic fatty acid containing bacterium isolated from acid beverages. **Int. Journal, of Syst. And Evol. Microb.**, v.52, p.1681-1685, 2002.
39. MATTICK, A.T.R.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci, *Lancet*, 2, p.5-7, (1947), In: THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin chapter 18, In: **Natural food antimicrobial system** edited by Naidu, A.S. CRC press London, 2000.
40. MCINTYRE, S.; IKAWA, J.L.; PARKISON, N.; HAGLUND, J.; LEE, J. Characteristics of an acidophilic bacillus strain isolated from shelf-stable juice, **Journal food protection**, v.58, n.3, p.319-321, 1995.
41. Mc KNIGHT, I.C.S. **Isolamento e identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a partir de sucos de maracujá e abacaxi pasteurizados, e determinação da resistência térmica de seus esporos.** 2003, 128p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
42. MEANWELL, L.J. The influence of raw milk quality on “slowness” in cheesemaking, *Proc. Soc. Agr. Bacteriol (Abstracts)*, 19, p.1-3, (1943), In: THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin chapter

- 18, In: **Natural food antimicrobial system** edited by Naidu, A.S. CRC press London, 2000.
43. ORR, R.V.; SHEWFELT, R.L.; HUANG, J.C.; TEFERA, S. BEUCHAT, L.R. Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses and comparison with spore and vegetative cell populations, **Journal of food protection**, v.63, n.11, p.1517-1522, 2000.
44. PALLAS, J.E.; HAMDY, M.K. Effects of thermoradiation on bacteria, **Appl. Environ. Microbiol.** V.32, p.250, 1976.
45. PARISH, M.E. Microbiological concerns in citrus juice processing, **Food Technology**, n.4, p.128-132, 1991.
46. PARISH, M.E.; HIGGINS, D.P. Yeast and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. **Journal food protection**, n.52, p.261, 1988.
47. PETTIPHER, G.L.; OSMUNDSON, M.E. Methods for the detection enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*, **Food Australia**, 52(7), P.293-295, 2000.
48. PETTIPHER, G.L.; OSMUNDSON, M.E.; MURPHY, J.M. Methods for detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and juice-containing drinks. **Letters in Applied Microbiology**, n.24, p.185-189, 1997.
49. PINHATTI, M.E.M.C.; VARIANE, S.; EGUICHI, S.V.; MANFIO, G.P. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices, **Fruit processing**, v.9, p.350-353, 1997.

50. PONTIUS, A.J.; RUSHING, J.E.; FOEGEDING, P.M. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. **Journal of food protection**, v.16, n.1, p.41-46, 1998.
51. PREVIDI, M.P.; COLLA, F.; VICINI, E. Characterization of *Alicyclobacillus* a spore-forming, thermophilic acidophilic bacterium, **Industria conserve**, v.70, n.2, p.128-132, 1995.
52. ROGERS, A.M. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*, **J. Bacteriol**, 16, p.321-325, 1928.
53. SAKO, Y.; UCHIDA, A.; KADOTA, H. Injury of deoxyribonucleic acid induced by acid-heating in spores of *Bacillus subtilis*, (1981) In: GOMBAS, D.E. Bacterial spore resistance to heat, **Food Technology**, v.11, p.105-110, 1983.
54. SANZ, B.; PALACIOS, P.; LOPEZ, P.; ORDONEZ, J.A. Effect of ultrasonic waves on heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores (1982), In: GOMBAS, D.E. Bacterial spore resistance to heat, **Food Technology**, v.11, p.105-110, 1983.
55. SILVA, F.M.; GIBBS, P.; VIEIRA, M.C.; SILVA, C.L.M. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes, **International journal of food microbiology**, v.51, p.95-103, 1999.
56. SPLITTSTOESSER, D.F.; CHUREY, J.J., LEE, C.Y. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices, **Journal of food protection**, v.57, n.12, p.1080-1083, 1994.

57. SPLITTSTOESSER, D.F.; LEE, C.Y.; CHUREY, J.J. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry, **Dairy food and environmental sanitation**, v.18, n.9, p.585-587, 1998.
58. STUMBO, C.R. Thermobacteriology in food processing, Academic press, New York, 1965, 236p.
59. TAMEGA, W.P. **Programa para determinação de parâmetros cinéticos em sistemas de processamento térmicos contínuos de alimentos**. 2005, 194p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
60. THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin chapter 18, In: **Natural food antimicrobial system** edited by Naidu, A.S. CRC press London, 2000.
61. TSURUOKA, N.; ISONO, Y.; SHIDA, O.; HEMMI, H.; NAKAYAMA, T.; NISHINO, T. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp nov. A novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japon. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.53, p.1081-1084, 2003.
62. UCHINO, F.; DOI, S. Acidothermophilic bacteria from thermal waters. **Agro. Biol. Chem**, 31, p.817-822, 1967.
63. UECKERT, J.E.; STEEG, T.; COLE, P.J. Synergistic antibacterial action of heat in combination with nisin and magainin II amide, **Journal appl. Microbiol.**, v.85, p.487-494, 1998.
64. VINTER, V. Sporulation of bacilli consumption of calcium by the cells and decrease in the protolytic activity of the medium during sporulation of *Bacillus*

- megatherium* (1956). In STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**, Academic press, New york, 1965, 236p.
65. WALLS, I.; CHUYATE, R. Alicyclobacillus-Historical perspective and preliminary characterization study, **Dairy, Food and environmental sanitation** vol. 18, n.8, p.499-503, 1998.
66. WHITEHEAD, H.R. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem J.* 27, p.1793-1800, 1933 In THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin chapter 18, In: **Natural food antimicrobial system** edited by Naidu, A.S. CRC press London, 2000.
67. WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK, P.; FOX, G.E.; DEINHARD, G.; PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal System Bacteriology**, 42, p.263-269, 1992.
68. YAMAZAKI, K.; ISODA, C.; TEDZUKA, H.; KAWAI, Y.; SHINANO, H. Thermal resistance and prevention of spoilage bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic beverages (1997a), In: JENSEN, N. *Alicyclobacillus* in Australia, **Food Australia**, v.52, n.7, p.282-285, 2000.
69. YAMAZAKI, K.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; SHINANO, H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores, **Letters in Applied microbiology**, v.25, p.153-156, 1997.

70. YAMAZAKI, K.; MURAKAMI, M.; KAWI, Y.; INOUE, N.; MATSUDA, T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks, **Food microbiology** 17: 315 – 320, 2000.
71. YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; SHINANO, H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Biosc. Biotech. Biochem.** V.60, n.3, p.543-545, 1996.

Parte 2: Microbiologia Preditiva de Alimentos

2.1. Histórico

O uso de modelos matemáticos em microbiologia de alimentos teve seu início aproximadamente em 1920, com a implementação de métodos para cálculo do tempo de destruição térmica de microrganismos relacionados com a indústria de enlatados. Porém, o interesse de aplicação por técnicas de modelagem matemática para descrever o crescimento e sobrevivência de microrganismo começou a partir da década de 80 (ROSS; MCMEEKIN, 1994).

A partir de 1983, o potencial da microbiologia preditiva começou a atrair considerável interesse em pesquisa, particularmente nos Estados Unidos, no Reino Unido, na Austrália e Europa (ROSS; MCMEEKIN, 1994).

Na Inglaterra o “Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF)”, lançou o programa denominado “Food Micromodel”, para descrever as respostas de crescimento de microrganismos patogênicos de origem alimentar frente aos fatores ambientais. Por outro lado, nos Estados Unidos foi lançado o programa “Pathogen Modelling Program”. Já na Europa o interesse por esta área resultou no lançamento do FLAIR (Food Linked Agricultural and Industrial Research), um programa envolvendo cerca de 30 laboratórios em 10 países da comunidade europeia com o interesse de avaliar as respostas de crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos em uma grande variedade de produtos naturais (ROSS; MCMEEKIN, 1994).

A microbiologia preditiva em alimentos apareceu com o estudo de duas linhas de pesquisa: o primeiro foi para controle de contaminação de peixe; trabalho

conduzido pelo Departamento de pesquisa industrial, Estação de pesquisa Torry , Escócia, com a publicação do modelo que descreveu o efeito da temperatura sobre a taxa de contaminação em peixe (SPENCER; BAINES, 1964). As pesquisas nesta área continuaram com os trabalhos de Olley e Ratkowsky (1973a,b) e Nixon em Nova Zelândia (NIXON, 1971). A segunda linha de pesquisa enfocou a prevenção do botulismo e outras intoxicações microbianas. Genigeorgis e seu grupo da Universidade da Califórnia definiram combinações de fatores que preveniram o crescimento do patogênico e posterior formação de toxina. Eles desenvolveram um modelo para redução logarítmica da bactéria em função das propriedades intrínsecas e extrínsecas dos alimentos, tais como pH, NaCl, etc; sendo que a redução logarítmica foi relatada como a probabilidade da bactéria crescer e produzir toxina (GENIGEORGIS et al., 1971).

McMeekin e outros (1993) apontaram dois fatores como responsáveis pelo crescente interesse na aplicação da microbiologia preditiva: o aumento marcante da incidência de importantes surtos de intoxicação alimentar durante a década de 80, ocasionando um aumento acentuado da preocupação pública em requerer o fornecimento de alimentos seguros e saudáveis, e a conscientização por parte de muitos microbiologistas de alimentos de que os métodos microbiológicos tradicionais para determinação da qualidade e segurança dos alimentos, eram muito limitados pelo tempo necessário para se obter um resultado e tinha portanto, pouco valor preditivo; e que os métodos indiretos baseados em mudanças químicas, físicos ou físico-químicos exigiam um número muito elevado de células

para fornecer uma resposta, o mesmo ocorrendo com muitos métodos rápidos propostos.

Buchanan (1993a) indicou ainda um terceiro fator que contribuiu para aumento no interesse da aplicação da microbiologia preditiva, a crescente facilidade de acesso aos computadores, visto que as ferramentas estatísticas, matemáticas e microbiológicas já existiam, mesmo antes da expansão dos estudos em modelagem.

Durante a década de 80 o aumento da atenção na modelagem foi impulsionada também pela preocupação com microrganismos veiculados por alimentos; dentre estas pesquisas destacam-se a de Metaxapoulos et al. (1981a,b) que modelaram a taxa de crescimento de *Staphylococcus* sp. em salame. Ratkowsky et al. (1982) e Ratkowsky et al. (1983) implementaram modelos para taxa de crescimento como função da temperatura. Broughall et al. (1983) introduziram o modelo relacionado com a taxa de crescimento bacteriano em função da temperatura e atividade de água, que depois foi modificado por Broughall e Brown (1984) para incluir o efeito do pH. Em 1987 Gibson et al. modelaram a taxa de crescimento de *C. botulinum* sobre os efeitos da concentração de sal e temperatura. Usando, para o ajuste dos dados, a curva logística e a curva de Gompertz. O mesmo grupo, em 1988, modelou as respostas da *Salmonella* em meio laboratorial afetado pelo pH, cloreto de sódio e temperatura de estocagem. Todos esses esforços no campo da microbiologia preditiva resultaram, como mencionado anteriormente, na implementação de programas como a “Food Micromodel” e “Pathogen Modeling Program”.

Atualmente são inúmeros os modelos matemáticos utilizados em microbiologia preditiva, desde a análise de dados da curva de crescimento até programas completos de modelagem, passando por aqueles que estudam os efeitos de variáveis independentes sobre as variáveis dependentes (análise multivariada).

2.2. Desenvolvimento de modelos preditivos.

Os modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos são mais empíricos do que aqueles utilizados nos processos fermentativos. Nos alimentos, ao contrário do que se observa normalmente nos processos fermentativos, o tipo e concentração de nutrientes não são conhecidos e, em geral, não são limitantes. Além disso, os microrganismos presentes estão inicialmente em pequena quantidade e freqüentemente submetidos a condições sub-ótimas (WHITING; BUCHANAN, 1997).

Os modelos matemáticos que avaliam a segurança e qualidade dos alimentos estão baseados em técnicas de regressão linear e não linear; devendo ser estabelecidas suposições quanto à aleatoriedade, normalidade e **interpolação dentro da faixa dos fatores testados e não extrapolações, parcimônia (modelo que contenha o menor número de parâmetros possíveis) e especificações estocásticas (o quanto a resposta esperada se desvia da resposta observada ou real)** (MCMEEKIN et al., 1993; RATKOWSKY, 1993).

O desenvolvimento de modelos preditivos envolve uma série de estágios, dentre estes temos:

2.2.1. Identificação dos fatores a serem controlados

Nesta fase definem-se as características relacionadas a variáveis independentes; à variável dependente, ao inóculo e ao procedimento experimental. Assim, segundo Blackburn (2000) os fatores que afetam o crescimento e sobrevivência dos microrganismos nos alimentos podem ser agrupados dentro de três categorias:

- a) Fatores intrínsecos: são características próprias do alimento tais como pH, atividade de água (A_w), potencial de óxido-redução (Eh) e preservantes;
- b) Fatores extrínsecos: são características do meio no qual o alimento é estocado tais como temperatura, umidade, gás atmosférico;
- c) Fatores implícitos: são as características inerentes do microrganismo e como estas se comportam na presença de combinações dos fatores intrínsecos e extrínsecos.

Embora um grande número de fatores possa afetar o crescimento ou sobrevivência de um dado microrganismo, na maioria de alimentos é usual que somente alguns tenham maior efeito, sendo, portanto importante que estes estejam incluídos no modelo. Existem situações onde os modelos são desenvolvidos sem muito pensamento prévio ao espaço das aplicações futuras, resultando em uma escolha imprópria de fatores controlados e a limitação de seu uso. Uma estratégia, portanto, é conhecer as características do alimento assegurando-se de que os fatores sejam selecionados para refletir o problema (Blackburn, 2000).

Para Whiting (1997), o comportamento microbiano é determinado basicamente pela temperatura, pH, Atividade de água e atmosfera. Ross e McMeekin (1994) incluíram ainda a concentração de nitrito de sódio e de ácidos orgânicos como fatores que usualmente são incluídos no modelo.

A faixa de variação dos fatores ambientais deve incluir valores de interesse quando a aplicação do modelo; sendo que o uso fora da faixa estudada no desenvolvimento do modelo pode ser perigoso (WHITING, 1997).

A resposta medida denomina-se variável independente caracterizando-se como mudança de densidade da população bacteriana em função do tempo. Esta mudança é freqüentemente expressa como sendo a velocidade de crescimento (μ), podendo também ser representada pelo tempo de duração da “fase lag” (λ), tempo de geração ou o tempo para se atingir uma determinada densidade populacional (κ).

2.2.2. Inóculo

Em geral, o tamanho do inóculo parece não afetar a velocidade de crescimento exponencial ou a populacional máxima atingida (BUCHANAN; PHILLIPS, 1990). A duração da “fase lag”, no entanto, pode ser influenciada pelo tamanho do inóculo, dependendo do limite de detecção do método na determinação da variável resposta a ser modelada. O tamanho de inóculo tem que assegurar de que a resposta microbiana possa ser medida. Deve-se ressaltar que inóculos grandes requerem geralmente um sistema mais severo do que aqueles usados normalmente na preservação (BLACKBURN, 2000).

2.2.3. Meios experimentais

Segundo McMeekin e outros (1993) o sistema experimental usado no desenvolvimento de um modelo preditivo será sempre baseado em um meio de crescimento que pode ser um meio de laboratório ou o próprio alimento. Os meios líquidos de laboratório possibilitam a utilização de maior variedade de métodos de detecção que podem ser diretos ou indiretos. Em alimentos geralmente aplicam-se métodos diretos de contagem de células viáveis em placas ou o número mais provável (NMP). Os meios laboratoriais podem não simular, com exatidão, as condições do alimento ao qual se pretende aplicar o modelo preditivo, sendo, portanto, necessária uma validação nesse alimento. **Em contrapartida, os modelos gerados a partir de um alimento são específicos somente para esse produto.**

2.2.4. Planejamento experimental

A faixa de condições, sobre as quais o modelo tem que operar tem que ser definida, pois os modelos empíricos não são aplicados além da faixa definida na qual o modelo foi gerado. Nessas condições é requerido que os fatores de crescimento possam ser alterados facilmente. Embora a heterogeneidade de muitos alimentos os tornem difícil para geração de dados, existem alguns particularmente homogêneos como o leite, que podem ser utilizados. Na maioria dos casos os meios microbiológicos laboratoriais são usados porque são de fácil modificação, assim pode-se usar um acidulante e um umectante para ajustar o pH e A_w respectivamente. Se o modelo é para ser aplicado em grande escala de alimentos, então o uso de produtos químicos menos inibitórios deve ser aplicado

para evitar predições perigosas (onde o crescimento microbiano é predito mais lentamente do que acontece realmente). Entretanto, se o modelo for pretendido para alimentos específicos então a escolha dos fatores pode necessitar ser mais focalizada, como para, ácidos orgânicos específicos a fim de incluir os efeitos relacionados à molécula não dissociada (BLACKBURN, 2000).

Os tempos da amostragem são uma consideração importante para implementação do planejamento e devem ser concentrados em torno das regiões de mudanças mais rápidas da curva de crescimento, como a extremidade da fase de aceleração negativa para modelos de crescimento. A escolha das combinações dos fatores deve também ser considerada. Pode ser o caso de um planejamento composto central mais apropriado para gerar modelos particulares, como aqueles para a inativação térmica. Entretanto, para outros modelos, tais como aqueles que descrevem uma região de interesse, pode ser na área onde a resposta que está sendo medida é mais variável (interface de crescimento / não crescimento) então as medições poderão necessariamente ser tomada nestas regiões. O uso de procedimentos de “screening” pode ser útil para definir as variáveis de interesse e o uso de medidas de densidade ótica pode ser particularmente usado para este propósito (BLACKBURN, 2000).

2.2.5. Coleta de dados

A parte mais laboriosa é a geração de dados de crescimento, sobrevivência ou inativação térmica do microrganismo. A quantificação dos microrganismos, a um determinado tempo, é realizada por um método padrão de contagem das colônias,

mas as medidas de densidade ótica e medidas de condutância podem também ser usadas (BLACKBURN, 2000).

Uma caracterização das fases de crescimento microbiano pode ser definida a partir da Figura 2.1:

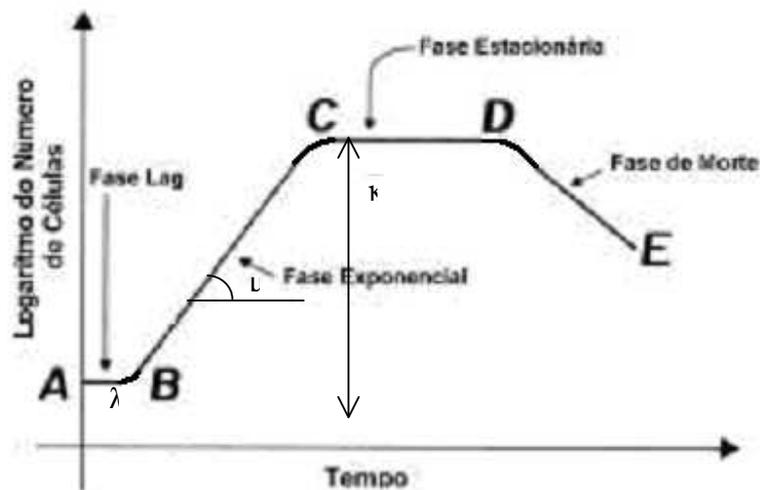


Figura 2.1. Curva padrão do crescimento bacteriano a temperatura constante.

“fase lag”: é o tempo de adaptação fisiológica e bioquímica das células para que possam ser capazes de explorar o ambiente onde se encontram.

Fase exponencial: denominada também fase de crescimento onde ocorre síntese de cada componente celular (enzimas, moléculas estruturais, DNA, etc.). Nesta fase todo o metabolismo está direcionado para a reprodução. A velocidade de crescimento pode ser expressa como “velocidade de crescimento absoluto”, que indica o aumento da densidade da população com o tempo. O tempo necessário para a população microbiana dobrar é denominado tempo de geração.

Fase estacionária: nesta fase ocorre a morte celular e lise devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos no meio de crescimento. Nesta fase a velocidade de crescimento é equivalente à velocidade de morte celular. A população máxima é atingida nesta fase.

Fase de morte: existe maior acúmulo de substâncias tóxicas, determinando uma velocidade de morte celular maior do que a capacidade do meio em proporcionar a reprodução ou difusão celular.

A “fase lag” e a fase exponencial são as de maior interesse, pois para os alimentos a deterioração ocorre antes que os microrganismos cheguem à fase estacionária. Assim quanto maior é a “fase lag” maior será a vida de prateleira, ou quanto maior for a velocidade de crescimento na fase exponencial menor será a vida de prateleira do produto.

2.2.6. Modelagem matemática e validação de modelos preditivos

Esta etapa envolve a análise dos dados para produzir o modelo e posterior validação matemática do ajuste dos dados ao modelo (BLACKBURN, 2000).

A escolha de uma função para descrever uma determinada resposta é um exercício estatístico, em contraste, o ajuste da função escolhida aos dados experimentais é mais um exercício de álgebra, e consiste na determinação dos valores dos parâmetros que melhor ajustam o modelo escolhido ao conjunto de dados coletados. O processo de ajuste de uma função está baseado no princípio dos mínimos quadrados (MCMEEKIN et al., 1993).

Os modelos matemáticos podem ser classificados como lineares e não lineares nos seus parâmetros. De acordo com Ratkoswky (1983a) os modelos não lineares

podem ainda se classificar como próximos ao linear ou distantes do linear conforme as características dos estimadores dos parâmetros. Existem vários procedimentos numéricos iterativos para obtenção das estimativas de mínimos quadrados dos parâmetros de um modelo não linear, entre eles pode ser citado o método de Gauss-Newton (NETER et al., 1996).

São várias as técnicas de modelagem tanto para sobrevivência e crescimento de microrganismos e os modelos podem ser descritos em três níveis:

2.2.6.1. Nível primário

São modelos que descrevem a mudança do número de microrganismos em função do tempo (Figura 2.2) (BLACKBURN, 2000). A resposta pode ser medida diretamente como a densidade da população microbiana, por medidas indiretas ou produtos do metabolismo microbiano (WHITING; BUCHANAN, 1993). Cada curva de população vs tempo pode ser descrita por um grupo de valores específicos para o cálculo dos parâmetros do modelo. Exemplos de modelos primários incluem o modelo de Gompertz (GIBSON et al., 1987; BUCHANAN et al., 1989); modelos linear e não linear de inativação térmica (Abraham et al., 1990); modelos de sobreviventes e inativação (Kamau et al., 1990), valores da taxa de crescimento (MCMEEKIN et al., 1987) e o modelo de Baranyi (BARANYI; ROBERTS, 1994).

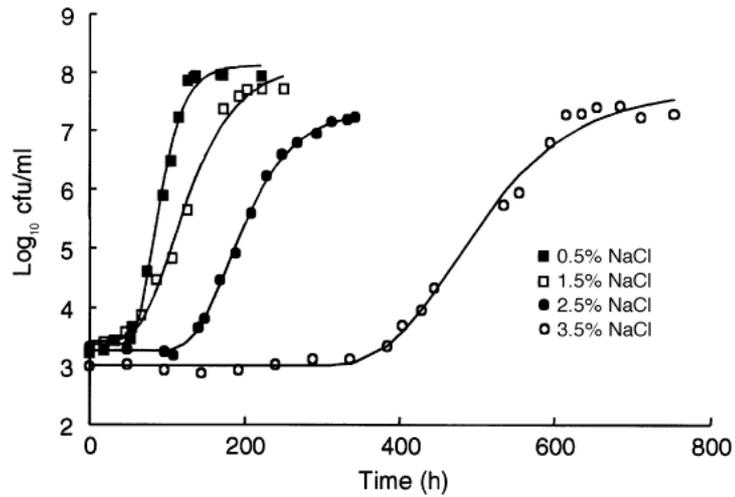


Figura 2.2. Curva de crescimento de *Aeromonas hydrophila* modelados pela equação de Gompertz.

2.2.6.2. Nível secundário

Descreve as respostas de um ou mais parâmetros do modelo primário frente às mudanças das condições do meio, tais como temperatura, pH, Aw (Figura 2.3) (MCDONALD; SUN, 1999; BLACKBURN, 2000).

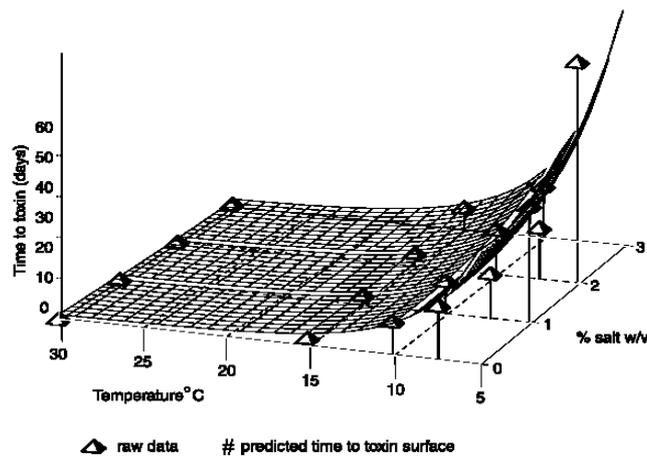


Figura 2.3. Influência da temperatura e concentração de sal no tempo mínimo para produção de toxina por *Clostridium botulinum*.

Quando um grupo específico de alimentos está sendo modelado, e a temperatura é a variável de interesse, os modelos podem ser baseados nas equações de Arrhenius, de Bélerádek (modelo de raiz quadrada) (SKINNER et al., 1994) ou modelo de superfície de resposta (BUCHANAN; PHILIPS 1990).

A equação de Arrhenius assume que a velocidade de crescimento é controlada pela velocidade limite de uma única reação enzimática. Por outro lado, o modelo de Bélerádek está baseado na relação linear que existe entre a raiz quadrada da velocidade de crescimento e a temperatura; este modelo ainda assume que os fatores ambientais são independentes, ou seja, que não existe interação entre os fatores.

As equações de regressão polinomial não assumem nenhuma relação mecanística entre a variável dependente e a variável independente, neste caso a equação resultante representará o melhor ajuste a um conjunto de dados em particular. Quanto mais complexa a equação com interações e termos quadráticos, melhor será o ajuste da equação aos dados de origem (WHITING; BUCHANAN, 1997).

2.2.6.3. Nível terciário

São aplicações de um ou mais modelos secundários e primários para gerar programas ou softwares (MCDONALD; SUN, 1999). Entre os softwares importantes temos:

- Food Micromodel. Implementado pelo Ministério de Agricultura da Inglaterra, o Food Micromodel é um software consistente de modelos matemáticos que permitem ao usuário prever o crescimento, sobrevivência e inativação térmica de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, usando um computador pessoal (BLACKBURN, 2000);
- Pathogen Modeling Program. Desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. 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 preveem o incremento da população microbiana em função do tempo (BUCHANAN 1991);
- Pseudomonas Predictor. Desenvolvido pela Universidade de Tasmânia, o software está baseada no modelo de crescimento de Pseudomonas e pode ser aplicado para alimentos estocados em diferentes atmosferas, podendo ser avaliado os perfis de temperatura (NEUMEYER et al., 1997);
- Seafood Spoilage Predictor. Desenvolvido pelo Ministério da Pesca da Dinamarca, o software facilita o uso prático de modelos matemáticos. Pode prever o efeito de temperaturas constantes e variáveis sobre a taxa relativa de contaminação do alimento (DALGAARD, 1995);
- Outros softwares também foram desenvolvidos: o “Forecast” (BLACKBURN, 2000); “ERH CALC™” (JONES, 1994); “Decision Support System” (BLACKBURN, 2000); “ChefCad software” (NICOLAI et al., 1996);

“MIRINIZ software” (AVERY et al., 1996); “Quantitative risk assessment” (LOVATT, 1999); “Microfit” (BLACKBURN, 2000).

2.2.6.4. Validação matemática

Nesta fase realiza-se a validação via procedimentos de quantificação para verificar se o modelo encontrado descreve bem os dados experimentais (MCCLURE et al., 1994). É importante que o modelo preditivo tenha significado biológico. Há um número de fontes de variabilidade que podem ser inerentes ao microrganismo, a erros sistemáticos devido aos métodos analíticos de laboratório e às técnicas de modelagem impróprias em descrever inadequadamente os dados (BLACKBURN, 2000). Estima-se, que para modelos gerados utilizando meios de laboratório, o erro relativo na predição de taxas de crescimento específicas é 7-10%, para modelos primários e de 20-50% para modelos secundários (MASANA, 1999). Neste ponto existe um grau de aceitação ou rejeição do modelo e novos dados microbiológicos podem ser requeridos ou até mesmo o uso de uma técnica de modelagem mais apropriada. Ross (1996) introduziu dois índices de validação: o fator bias e o fator exatidão, que depois foram modificados e generalizados por Baranyi e outros (1999) para quantificar a confiança nas predições do modelo.

A adequação do modelo para predizer os dados pode ser determinada também graficamente com base em índices estatísticos e matemáticos (GIFFEL; ZWIETERING, 1999).

a) **Fator bias:**

Este fator, segundo Ross (1996) indica se a média dos valores observados se encontram acima ou abaixo da linha da de equivalência. Em outras palavras permite avaliar com o mesmo peso, em média, tanto os valores preditos que sobreestimam como os que subestimam os valores observados. A equação 2.1 representa o cálculo fator bias.

$$fator - bias = 10^{(\sum \log(P/O) / n)} \quad (2.1)$$

Onde:

n: número de dados;

P: valor predito;

O: valor experimental ou observado.

Quando o valor desse fator é maior do que 1 indica que o modelo sobre estima as observações sendo as predições falhas do lado perigoso “fail-dangerous”. Já quando esse valor é menor do que 1 indica que o modelo é seguro “fail-safe” (JEYAMKONDAN, et al. 2001; ROSS et al. 2000).

b) **Fator de exatidão**

O fator exatidão calcula a média da distância entre cada ponto e a linha da equivalência como uma medida de quão próximas, da média, as predições estão das observações (ROSS, 1996). A equação 2.2 apresenta o cálculo do fator exatidão.

$$fator - exatidão = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log \left(\frac{predito}{observado} \right) \right|}{n} \right)} \quad (2.2)$$

Este índice estatístico é sempre maior do que 1. Quanto maior é o fator exatidão, menos exato será o modelo. Ele é especialmente útil em casos de comparação de modelos que tem outros parâmetros de validação semelhantes.

a) Coeficiente de determinação ou coeficiente de regressão

O coeficiente de determinação (R^2) é também usado como uma medida total da predição alcançada. Ele mede a fração de variação sobre a média que é explicado pelo modelo. Para um valor de R^2 ($0 < R^2 < 1$) bem próximo de 1, melhor será a predição realizada pelo modelo (GRAU; VANDERLINDE, 1993; DUFFY et al., 1994).

b) Erro quadrado médio (MSE)

É a soma quadrática do resíduo dividido pelo número de graus de liberdade. Este parâmetro representa o desvio total das saídas preditas com o seu correspondente dado experimental. Esse erro pode ser considerado como absoluto ou relativo. Quanto menor é o MSE melhor é a adequação do modelo para descrever os dados (ADAIR et al, 1989). Assim, segue a equação 2.3

$$MSE = \frac{SSE}{n} = \frac{\sum (\mu_{obs} - \mu_{pred})^2}{n} \quad (2.3)$$

e) Resíduo Relativo absoluto médio (MARR)

MARR é expressa em porcentagem. O termo absoluto usado neste parâmetro estatístico indica o desvio do valor observado. Se o MARR for 25%, significa que em média, os valores preditos são 25% diferentes (acima ou abaixo) dos valores observados. Em média, os valores preditos podem ser 125% ou 75% dos valores observados (JEYAMKONDAN et al., 2001). Este parâmetro estatístico é similar ao fator de exatidão. Conforme observado na equação 2.4.

$$MARR = \frac{1}{n} \sum \left| \frac{o - p}{o} \right| * 100 \quad (2.4)$$

Onde: O é o valor observado, P é o valor predito e n o número de observações.

2.3. Estudo de modelos

2.3.1. Modelos de cinética e morte microbiana

O tratamento térmico é o processo que objetiva destruir as formas microbianas com capacidade de desenvolvimento durante uma certa condição de estocagem. Sendo os esporos bacterianos altamente resistentes às condições ambientais adversas, eles são usados como indicadores biológicos na avaliação do nível de esterilidade proposto.

A destruição térmica de uma população homogênea de microrganismos é considerada logarítmica, equivalentes à cinética química de uma reação de 1ª ordem (STUMBO, 1965). O fenômeno de destruição térmica pode ser representado pelo modelo de uma curva linearizada e semilogarítmica de

sobreviventes. A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição à temperatura constante, resulta em curva linearizada decrescente. A variação do número de sobreviventes com o tempo de exposição a uma temperatura constante é função do número de microrganismos inicialmente presentes, e é representada pela equação 2.5.

$$\text{Log}(N_f) = \text{Log}(N_0) - (k/2,303)t \quad (2.5)$$

Onde $\log(N_f)$ é o logaritmo decimal da população sobrevivente após um tempo (t) de exposição;

$\text{Log}(N_0)$ é o logaritmo decimal da população no tempo inicial (t=0);

k é a constante de velocidade específica de destruição por unidade de tempo (t).

Para um mesmo microrganismo todos os parâmetros de tratamento devem ser mantidos constantes durante o tempo de exposição estabelecido, pois a resistência térmica é função da concentração de vapor úmido presente.

Para o modelo de curva semilogarítmica de sobreviventes, o tempo necessário para destruição de 90% da população de esporos é o intervalo de tempo exigido para a curva percorrer 1 (um) ciclo logarítmico. O intervalo de tempo de redução decimal (valor D) é o principal parâmetro de avaliação das características de termorresistência da população microbiana homogênea.

O valor D ou tempo de redução decimal é o intervalo de tempo em minutos à temperatura constante de tratamento para uma redução de 90% da população microbiana, inicialmente presente no produto. Numericamente o valor D é o inverso negativo do coeficiente angular da equação da reta calculada utilizando o

método de regressão linear, através dos mínimos quadrados, aplicado a região linear da curva de sobrevivência. O valor D relaciona-se à constante específica de reação através da relação: $D=(2,303/k)$. Portanto a equação 2.5 pode ser igualmente representada por:

$$\text{Log}(Nf) = \text{Log}(No) - (1/D)t \quad (2.6)$$

A relação entre tempos de processo a diferentes temperaturas para um mesmo nível de destruição microbiana é definida através da curva do tempo de destruição térmica ou pela curva fantasma de destruição térmica. A curva fantasma é representada pelo logaritmo decimal do tempo de redução decimal (D) em função da temperatura de referência. Para o modelo da curva fantasma semilogarítmica, o intervalo de temperatura necessário para a redução de 90% do tempo de redução decimal (valor D) é denominado valor z. Se o valor D_{T_1} à temperatura T_1 for conhecido, então o valor D_{T_2} à temperatura T_2 pode ser calculado, através da curva TDT representada pela equação:

$$\frac{D_{T_2}}{D_{T_1}} = 10^{(T_1 - T_2)/z} \quad (2.7)$$

Portanto, o valor z representa o intervalo de temperatura em °C, que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição, ou seja, no valor D. Quanto menor o valor z, tanto maior será a variação de velocidade de destruição com a temperatura de exposição.

2.3.2. Modelo de Gompertz (GIBSON et al., 1987)

É uma função de quatro parâmetros que descreve uma curva sigmoidal assimétrica. É expressa como:

$$Lt = A + C[\exp[-\exp(-B(t - M))]] \quad (2.8)$$

Onde:

Lt: é o Log₁₀ da contagem bacteriana (número de unidades formadoras de colônia, UFC a um tempo t).

A: é o valor da assíntota do Log(N) quando t decresce indefinidamente, equivalente ao Log₁₀ do número inicial de microrganismos,

C: é o valor da assíntota superior do Log (N) quando t aumenta indefinidamente,

M: tempo na qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima,

B: velocidade de crescimento relativa no tempo M,

t: é o tempo

Em uma primeira análise essa equação parece complexa. No entanto os quatro parâmetros podem ser relacionados matematicamente com caracteres culturais familiares aos microbiologistas (BUCHANAN, 1993):

$$\mu = B \times C / e$$

$$GT = [\log_2][e/B \times C]$$

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

$$MPD = A + C$$

e : constante neperiana

Onde: μ : é a velocidade de crescimento exponencial [Log(UFC/ml)/h),

GT: tempo de geração (h)

λ : duração da fase lag,

MPD: log da densidade máxima da população [log(UFC/ml)];

A equação 2.8 é utilizada nos programas “Food Micromodel” do Reino Unido e PMP dos Estados Unidos. Mesmo ela sendo muito usada, a equação de Gompertz modificada possui inúmeras falhas. A fase lag não é paralela ao eixo das abscissas e a assíntota matemática (número de células do inóculo) está fora de escala em tempo negativo. A equação não apresenta um período de aumento linear durante a fase de crescimento exponencial, como é observado com a maioria das curvas de crescimento. Sendo assim, 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 correspondentes determinadas por um período de crescimento linear (WHITING; BUCHANAN, 1997).

2.3.3. Modelo de Baranyi e Roberts (1994)

Para solucionar os problemas mostrados pelo modelo de Gompertz modificado e fornecer uma base mais mecanística e biológica, Baranyi e Roberts (1994) propuseram um modelo que incluiu uma fase de crescimento exponencial linear, $\mu_{(x)}$ e uma “fase lag” determinada por uma função de ajuste, $\alpha_{(x)}$.

Uma hipótese básica é que a cinética foi determinada por 3 classes de variáveis:

- Condições intracelulares: definem as condições de estado da célula. Assume-se que podem ser medidas por certas substâncias bioquímicas, tais como enzimas ou RNA, DNA. A concentração por célula de n entidades bioquímicas pode ser denotada por $z(t) = (z_1(t) \dots z_n(t))$. Também pode se referir a $z(t)$ como vetor de estado interno ou fisiológico;
- Condições extracelulares dependentes de mudanças provocadas pelo metabolismo bacteriano: estas condições estão envolvidas dentro de um vetor, $c(t)$, chamado também de vetor de estado externo de categoria 1;
- Condições extracelulares independentes da cultura de crescimento: este vetor é denominado como vetor de estado externo de categoria 2, denotado por $D(t)$. Como indicado pela denotação é possível ter mudanças em relação ao tempo. A variável mais comum modelada por este vetor é a temperatura, $T(t)$.

Para os autores o vetor de estado interno, $z(t)$ tem dois componentes: $z_1(t)$, que representa a quantidade por célula de uma substância crítica restrita ao crescimento (tais como RNA ou ATP) e $z_2(t)$ a biomassa celular. O vetor de estado externo de categoria 1, $c(t)$, tem apenas um componente (a concentração de nutrientes do ambiente extracelular). Os autores assumem que a falta de uma substância crítica tem um efeito limitante de acordo com a cinética de Michaelis–Mendel (limitação pela esquerda). Similarmente a diminuição da concentração de nutrientes causa limitações do crescimento pela direita:

$$\frac{dz_1(t)}{dt} = k_1 z_1(t) \tag{2.9}$$

$$\frac{dz_2(t)}{dt} = \frac{z_1(t)}{k_z + z_1(t)} k_2 \frac{c_1(t)}{k_c + c_1(t)} z_2(t) \quad (2.10)$$

$$\frac{dc_1(t)}{dt} = -\frac{1}{y} \frac{dz_2(t)}{dt} \quad (2.11)$$

Onde k_1 , k_2 , y , k_z , e k_c são os parâmetros do modelo e dependem unicamente de variáveis externas de categoria 2. A concentração celular, $x(t)$, assume-se que é proporcional ao total da biomassa, assim:

$$\mu(t) = \frac{\frac{dz_2(t)}{dt}}{z_2(t)} = \frac{z_1(t)}{k_z + z_1(t)} k_2 \frac{c_1(t)}{k_c + c_1(t)} \quad (2.12)$$

Note que, na equação anterior já existe uma simplificação porque $z_1(t)$ inicialmente aumenta, mas diminui quando as células se dividem, além de refletir a separação dos efeitos ambientais internos e externos.

A taxa específica de crescimento depende do estado fisiológico da célula (através de z_1); das condições externas de categoria 1 (através de c_2); e das condições externas de categoria 2 (através das constantes do modelo). Denotando: $v = k_1$, $\mu_{\max} = k_2$ e

$$\alpha(t) = \frac{z_1(t)}{k_z + z_1(t)} \quad (2.13)$$

$$u(t) = \frac{c_1(t)}{k_c + c_1(t)} \quad (2.14)$$

Os valores das funções $\alpha(t)$ e $u(t)$ estão entre valores de 0 e 1, e k_2 pode ser chamado de taxa específica de crescimento. A função $\alpha(t)$ descreve o processo de

ajuste controlado pelo acúmulo da substância crítica $z_1(t)$. Portanto $\alpha(t)$ converge para 1, quando t aumenta, similarmente ao modelo de Hills e Wright (1994). Por outro lado a função limitante $u(t)$ descreve a transição para a fase estacionária, sendo que algumas considerações foram realizadas de acordo com considerações biológicas.

A limitação de nutrientes em alimentos aparece geralmente apenas a altas concentrações celulares. Para simplificar o porque em Microbiologia de Alimentos, a modelagem do efeito do nutriente limitante é pouco significativa, $u(t)$ é aproximado por uma função simples que depende do parâmetro de densidade celular máxima:

$$u(t) \approx 1 - \left(\frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \quad (2.15)$$

Onde X_{\max} é a concentração máxima de células, m é o parâmetro de curvatura que caracteriza a transição da curva de crescimento para a fase estacionária. Nota-se que $x(t)$ pode estar envolvido dentro dos componentes de $c(t)$. O modelo obtido para $x(t)$ fica:

$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{z_1(t)}{k_z + z_1(t)} \mu_{ma} x \left(1 - \left(\frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \right) x(t) \quad (2.16)$$

Onde:

$$\frac{dz_1(t)}{dt} = \nu z_1(t)$$

Destas últimas expressões observa-se o efeito do crescimento bacteriano no ambiente celular, expressado como limitante do crescimento, onde a fase estacionária é causada pela alta concentração de células. O erro desta simplificação aparece apenas em altas concentrações celulares.

A vantagem desta simplificação é que se $D(t)$ é constante, então o sistema de equações diferenciais anteriores tem uma solução explícita, que facilita o procedimento de ajuste da curva.

Como publicado previamente por Baranyi e Roberts (1994), a solução para o logaritmo natural da concentração celular $y = \ln x(t)$ é:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A_n(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{\ell^{m\mu_{\max} A_n(t)} - 1}{\ell^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (2.17)$$

Onde:

y_0 : população inicial no tempo t_0

$Y(\max)$: população máxima

μ_{\max} : taxa de crescimento máxima

n : parâmetro relacionado à curvatura depois da “fase lag”

m : parâmetro relacionado à curvatura depois da fase exponencial.

A função $A(t)$ é expressa como:

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{\max} t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0})}{\mu_{\max}}, \text{ para } h_0 = -\ln \alpha_0$$

Onde o parâmetro α_0 é chamado de estado fisiológico das células no tempo $t=t_0$; conseqüentemente h_0 usa-se para caracterizar o estado fisiológico inicial da célula.

Além de apresentar várias vantagens computacionais quando comparado com outras funções sigmóides, seu uso principal é predizer a resposta de crescimento bacteriano mesmo com alteração de temperatura durante as fases lag e estacionária.

Em conclusão, esta função considera características do meio e do microrganismo em questão; critério importante devido às influências dos diferentes fatores ou variáveis que provocam mudanças no meio e no metabolismo do microrganismo, analisando o comportamento do microrganismo de forma mais completa que a equação de Gompertz.

2.3.4. Modelo de superfície de resposta

Modelos polinomiais representam aproximações puramente empíricas da variável resposta às variáveis independentes. Em microbiologia preditiva o modelo é construído na forma de um polinômio que pode relacionar parâmetros de crescimento e/ou morte microbiana em função de variáveis individuais e independentes, tais como temperatura, pH, A_w , etc.

Uma regressão linear múltipla pode ser usada para determinar o melhor ajuste de seus parâmetros à variável resposta (ROSS; MCMEEKIN, 1994). A equação geral de regressão pode ser da forma:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_j X_j \quad (2.18)$$

Onde, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_j$ são parâmetros a serem estimados e X_1, X_2, \dots, X_j são as variáveis estudadas.

2.3.5. Modelagem Probabilística de Regressão Logística

O uso de modelagem de regressão logística tem sido explorado durante décadas sendo aplicado em várias áreas, desde pesquisas biomédicas, negócios e finanças até em áreas de engenharia (HOSMER; LEMESHOW, 2000).

Muitas funções de distribuição foram propostas para o uso na análise de variáveis (HOSMER; LEMESHOW, 2000). São duas as razões para escolher uma distribuição logística. Do ponto de vista matemático é extremamente flexível e uma função facilmente usada e se presta para a interpretação e significado biológico (HOSMER; LEMESHOW, 2000).

A modelagem probabilística enfoca a atenção abrangente entre crescimento e não crescimento microbiano e os modelos probabilísticos podem ser usados para definir as combinações das diferentes condições dos fatores envolvidos no processo (fatores ou barreiras) que influenciam na probabilidade de se o microrganismo crescer e se reproduzir (LOPEZ-MALO *et al.*, 2000; LOPEZ-MALO; PALOU, 2000).

Estatisticamente um modelo de regressão logística relata a probabilidade de ocorrência de um evento Y , condicionado a um vetor X , de variáveis explicativas.

Suponhamos que existam n relatos individuais chamados de eventos. Eles podem ser de sucesso ou de falha. Então pode ser definido $y_i = 1$ se o i -ésimo evento for de sucesso e de $y_i = 0$ se o i -ésimo evento for de falha. Suponhamos ainda que para cada um dos n relatos, pode ser medido p variáveis independentes (x_{i1}, \dots, x_{ip}) , sendo que podem ser qualitativas tais como sexo e raça ou quantitativas como pressão e concentração de células. O assunto consiste em relacionar como essas variáveis independentes (x_{i1}, \dots, x_{ip}) influenciam a variável dependente y_i . O possível modelo seria a técnica de regressão linear ordinária que assume que os y_i estão normalmente distribuídos com média p_i e variância σ^2 , sendo que p_i é definido como a probabilidade de sucesso. Numericamente a expressão é:

$$p_i = p(y_i = 1 | x_{i1}, \dots, x_{ip}) \quad (2.19)$$

$$1 - p_i = p(y_i = 0 | x_{i1}, \dots, x_{ip}), \quad i = 1 \dots n \quad (2.20)$$

A equação 2.20 é dependente linearmente em X_{ij} 's e o modelo pode ser escrito como:

$$p_i = \sum_{j=1}^p b_j x_{ij} \quad (2.21)$$

A técnica dos mínimos quadrados é aplicada para estimar os coeficientes b_j , conseqüentemente um novo valor de p_i poderia ser estimado pela substituição do valor de x_{ij} dentro da equação anterior. A dependência da probabilidade de

sucesso frente às variáveis independentes poder ser assumido através da equação 2.22 (LEE, 1992). Este modelo específico de regressão logística pode ser expresso também pela equação 2.23:

$$p_i = \frac{\exp\left[\sum_{j=0}^p b_j x_{ij}\right]}{1 + \exp\left[\sum_{j=0}^p b_j x_{ij}\right]} \quad (2.22)$$

$$\text{e, } 1 - p_i = \frac{1}{1 + \exp\left[\sum_{j=0}^p b_j x_{ij}\right]} \quad (2.23)$$

Onde $x_{i0}=1$ e b_j são os coeficientes do modelo.

O logaritmo natural da taxa entre p_i e $1-p_i$ resulta ser uma função linear simples para x_{ij} (LEE, 1992)

$$\text{Ln}\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = g(x) = \sum_{j=0}^p b_j x_{ij} \quad (2.24)$$

Onde $g(x)$ é chamada de transformação logística, logit, de p e a equação 2.24, o modelo logístico linear. A importância desta transformação é que $g(x)$ possui muitas propriedades desejáveis de um modelo de regressão linear. O logit, $g(x)$, é linear nestes parâmetros, pode ser contínuo, e pode variar dependendo da faixa

de x (HOSMER; LEMESHOW, 2000). A segunda diferença importante entre os modelos de regressão logística e linear refere-se à distribuição condicional da variável resposta. No modelo de regressão linear assume-se que a observação da variável resposta pode ser expressa como $y = E(Y|X) + \varepsilon$. Onde ε é chamado de erro, que expressa o desvio das observações em torno de uma média condicional. Uma suposição comum é que o erro esteja distribuído normalmente com média zero, com uma certa variação constante através dos níveis da variável independente. Assim, uma distribuição condicional da variável resposta pode ser normal com média $E(Y|x)$ e variância constante. Isto não é o caso de uma variável dicotômica. Nesta situação o valor da variável resposta, dado x , pode ser expressa como $y=p(x) +\varepsilon$. Onde a quantidade ε pode assumir dois valores possíveis. Si $y=1$ então $\varepsilon=1-p(x)$ com probabilidade $p(x)$, e si $y=0$ então $\varepsilon=-p(x)$ com probabilidade $1-p(x)$. Desta forma ε tem uma distribuição com média zero e variância igual a $p(x)[1-p(x)]$. Isto é, a distribuição condicional da variável resposta segue uma distribuição binomial com probabilidade dada pela média condicional, $p(x)$.

Em resumo, em uma análise de regressão quando a variável resposta é dicotômica temos:

- a) A média condicional da equação de regressão deve ser formulada para ser limitada entre um e zero. E o modelo logístico satisfaz esta condição.
- b) A distribuição binomial descreve que os erros podem estar distribuídos estatisticamente na qual a análise é baseada.
- c) Os princípios que se seguem numa análise de regressão linear também são usados na regressão logística.

Assim para duas variáveis independentes o modelo seria:

$$\text{Ln}\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = g(x) = \sum_{j=0}^p b_j x_{ij} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_1 x_2, \quad (2.25)$$

onde os coeficientes b_i são os parâmetros a serem estimados pelo ajuste do modelo para os dados experimentais; x_1 e x_2 as variáveis em estudo.

Em Microbiologia Preditiva este tipo de modelagem já tem sido aplicado: Lopez-Malo; Guerrero e Alzamora (2000) aplicaram regressão logística para prever condições de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* frente a fatores como A_w , pH e sorbato de potássio. Outros dois trabalhos (LOPEZ-MALO; PALOU, 2000 e PEÑA; ASSIS; MASSAGUER, 2004) introduziram no modelo probabilístico a variável tempo de estocagem ou de adaptação, resultando em modelos que puderam ser usados para prever a vida de prateleira do produto em questão.

2.3.6. Modelagem por Redes Neurais Artificiais

No campo da Microbiologia Preditiva, Ross e McMeekin (1994) e Whiting e outros (1997) desenvolveram modelos matemáticos tendo como meta a inativação do crescimento microbiano. A não linearidade é inerente na determinação da população microbiana, mas o uso de técnicas e de modelos lineares descreve a evolução de microrganismos como função do tempo (modelo primário). Descrever o crescimento de uma bactéria requer um enfoque de natureza não linear.

Portanto, a técnica de modelagem por redes neurais artificiais pode ser usada como método alternativo. A baixa complexidade de redes neurais artificiais pode ser investigada quanto a sua utilidade no campo da predição microbiológica.

Uma definição de redes neurais artificiais pode ser dada como sendo uma técnica de modelagem, inspirada na arquitetura dos sistemas nervosos biológicos, que consistem de um grande número de sistemas relativamente simples que funcionam em paralelo para tomar decisões rapidamente. De forma semelhante, redes neurais artificiais consistem de um grande número de elementos computacionais primitivos, os quais são dispostos em uma estrutura compactamente paralela. Tais elementos conhecidos como nodos são conectados por meio de sinapse artificial simbolizada por uma matriz de números, que podem ser ajustados por um processo de aprendizagem. Cada nodo pode receber múltiplos sinais de entrada e produzir um sinal de saída. Pode ser considerado como uma função complexa que relaciona a variável dependente às variáveis independentes, com diversos parâmetros ajustáveis, denominados pesos (SREEKANTH et al., 1998). Uma capacidade muito importante das redes neurais é a de relacionar os parâmetros de entrada e saída sem nenhuma relação anterior entre elas, sendo o processo de aprendizagem uma característica própria (SABLANI et al., 1995).

Segundo Baughman e Liu (1995), rede neural é uma ferramenta de modelagem empírica. Contudo, algumas diferenças notáveis existem entre redes neurais e modelos empíricos típicos:

1. Possuem melhor capacidade de filtragem que modelos empíricos tradicionais.

É massivamente paralela, de forma que cada nodo opera independentemente

dos outros. Cada nodo pode ser visto como um processador, com todos operando em paralelo. Devido a esse paralelismo, redes neurais têm melhor capacidade de filtragem e, geralmente, trabalham melhor que modelos empíricos tradicionais com dados incompletos ou com ruídos;

2. São mais adaptativos do que modelos empíricos, possuem algoritmos de treinamento específicos que ajusta o fator peso entre nodos até que se alcança o modelo desejado, que relaciona a entrada à saída. Se as condições mudam, de tal forma que o desempenho da rede é inadequado, pode-se retrainar a rede, nestas novas condições para corrigir o seu desempenho;
3. São verdadeiramente sistemas de múltipla entrada e múltipla saída. A maioria das ferramentas de modelagem empírica mapeia uma ou, no máximo, duas ou três variáveis dependentes. Redes neurais podem mapear tantas variáveis independentes quantas variáveis dependentes necessitar. Conseqüentemente, redes neurais trabalham melhor em modelos de reconhecimento do que sistemas de modelagem empírica tradicionais.

2.3.6.1. Fundamentos e relações biológicas

O neurônio biológico (Figura 4) é constituído da célula do corpo central, dendritos e axônio. O fluxo de informações vai dos dendritos para o corpo da célula, através de um ponto de conexão como o axônio, denominada sinapse (EBERHART; DOBBINS, 1990). A interpretação neurofísica de ativação e do sinal de saída envolve pulsos elétricos. Essas ativações estão relacionadas com pequenos pulsos na membrana e sinais através do axônio. O processamento da informação

dentro do neurônio biológico envolve duas operações diferentes: a primeira operação sináptica que proporciona um peso relativo nas entradas dos neurônios e a segunda operação somática que providencia agregação de ativação não linear da entrada do dendrito, com o qual os pesos das entradas fornecem sinais de saídas (THYAGARAJAN et al., 1998). Assim redes neurais artificiais, inspirada no funcionamento deste sistema, estão compostas de grande número de elementos computacionais, denominado de nodos ou neurônios artificiais, os quais são conectados por meio de sinapse artificial simbolizada por uma matriz de números (pesos), os quais podem ser ajustados por um processo de aprendizagem (ALDRICH; SLATER, 1995).

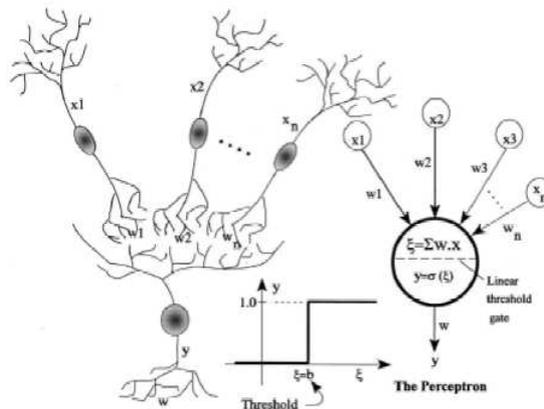


Figura 2.4. Interação de informação de neurônio biológico e sua analogia com o artificial.

2.3.6.2. Componentes de um nodo

O neurônio artificial pode ter múltiplas entradas, mas apenas uma saída. É denominado freqüentemente como elemento processador que realiza a maioria

dos cálculos na rede neural como mostrado na Figura 4. Os principais componentes segundo Baughman e Liu (1995) são:

- a) Entradas e saídas: a entrada para o i -ésimo nodo é representada pelo vetor de entrada \mathbf{a}_i . O nodo manipula estas entradas e calcula a saída \mathbf{b}_j , que pode ser entrada para outros nodos;
- b) Fatores pesos: são valores ajustáveis associados com as conexões entre os nodos de uma rede neural que atuam como fator que determina a saída do nodo. Cada entrada a_i é multiplicada pelo seu correspondente fator peso, W_{ij} , e, o nodo utiliza esta entrada ponderada para efetuar os cálculos;
- c) Limiar interno: fator importante que governa a saída do nodo. O j -ésimo nodo é denotado por T_j . O nodo calcula todos os valores W_{ij} , fazendo um somatório. Do calculo total de ativação, X_j , é subtraído o valor do limiar interno de acordo com a equação 2.26;

$$x_j = \sum_{i=1}^n (w_{ij} a_i) - T_j \quad (2.26)$$

- d) Funções de transferência ou ativação: Depois de calculado o valor X_j , o resultado passa à função de ativação;

$$f(w_j a - T_j) = f\left(\sum_{i=1}^n (w_{ij} a_i) - T_j\right) \quad (2.27)$$

Existem várias funções de ativação (BAUGHMAN; LIU, 1995) sendo as mais usadas:

- a) Função sigmoideal: tem valores limites de 0 (para $x_j = -\infty$) e 1 (para $x_j = +\infty$), sendo representada pela equação 2.28;

$$f(x) = \frac{1}{(1 + e^{-x})} \quad (2.28)$$

b) Função tangente hiperbólica: esta função tem valores limites entre -1 e +1, é descrita como;

$$f(x) = \frac{1 - e^{-x}}{1 + e^{-x}} \quad (2.29)$$

c) Função gaussiana: é freqüentemente utilizada como função de simetria radial, sendo representada pela equação 2.30.

$$f(x) = \exp\left(\frac{-x^2}{2}\right) \quad (2.30)$$

2.3.6.3. Algoritmos de treinamento

O algoritmo de retropropagação (Backpropagation) (DEMUTH; BEALE, 2002) é um algoritmo básico de treinamento. Consiste de dois passos através das diferentes camadas da rede: um passo para frente, a propagação, e um passo para trás, a retropropagação. No passo para frente, um vetor de entrada é aplicado aos neurônios da rede e seu efeito se propaga através da rede, camada por camada, produzindo um conjunto de saídas. Durante a propagação, os pesos sinápticos são todos fixos e na retropropagação, os pesos sinápticos são ajustados de acordo com uma regra de correção de erro. Especificamente, a resposta real da rede é subtraída de uma resposta desejada (alvo) para produzir um sinal de erro (HAYKIN, 2001).

A equação de iteração deste algoritmo pode ser representada pelas equações 2.31 e 2.32:

$$X_{k+1} = X_k + dX_k \quad (2.31)$$

Em que:

$$dX_k = mc.dX_{prev} + lr(1 - mc) \cdot \frac{de}{dX} \quad (2.32)$$

Onde:

k=iteração atual; X=vetor coluna de todos valores de pesos e bias; dXprev=variação anterior dos pesos e bias; mc=constante de momento; lr=taxa de aprendizagem; e=função objetivo (erro)

Este algoritmo geralmente é lento para aplicação em problemas práticos. Então foram desenvolvidos métodos com maior desempenho e velocidade de convergência. Sendo um destes o algoritmo de Levenberg-Maquardt, que foi feito para aproximar a velocidade de treinamento de segunda ordem sem ter que computar a matriz Hessian (DEMUTH; BEALE, 2002). A equação de interação deste algoritmo está representada pela equação 2.33.

$$X_{k+1} = X_k - (J^T J + \mu I)^{-1} J^T e \quad (2.33)$$

Onde: J=matriz Jacobiana, contém as derivadas primeiras dos erros da rede com respeito aos pesos e bias.

Um dos problemas que acontece durante o treinamento de uma rede neural é denominado sobre ajuste. O erro obtido com o conjunto de treinamento é um valor

muito pequeno, mas quando um conjunto de dados com respostas novas é apresentado à rede o erro obtido é grande. Isto significa que a rede memorizou os exemplos de treinamento, mas não aprendeu a generalizar (DEMUTH; BEALE, 2002).

Um procedimento para melhorar a generalização, evitando o sobre ajuste, é usar a regularização que envolve a modificação da função objetivo. No algoritmo de regularização Bayesiana a função objetivo assume a forma da equação 2.34 (DEMUTH; BEALE, 2002).

$$F = \alpha.SSE + \beta.SSW \quad (2.34)$$

Onde:

SSE=somatório dos erros quadrados

SSW= somatório do quadrado dos pesos e bias; α e β = parâmetros da função objetivo.

Os parâmetros de regularização são obtidos com a estrutura Bayesiana, que estima estes parâmetros usando técnicas estatísticas. Como a técnica de regularização bayesiana requer o cálculo da matriz de Hessian, o algoritmo de treinamento associado à regularização é o de Levenberg-Maquardt (FORESSE; HAGAN, 1997). Uma das características deste algoritmo é dar uma medida de quantos parâmetros da rede (pesos e bias) estão efetivamente sendo usados. Este número efetivo de parâmetros permanece aproximadamente constante, não importando quão grande é o numero total de parâmetros da rede. (DEMUTH; BAELE, 2002).

Quando o número efetivo de parâmetros for muito próximo ao valor de número atual de parâmetros, provavelmente a rede não está representando adequadamente a função real. Neste caso, é necessário aumentar o número de neurônios da camada intermediária e refazer o treinamento da rede. Se a rede maior tiver o mesmo número de parâmetros efetivos, então a rede é do tamanho adequado; senão, mais neurônios na camada intermediária deverão ser adicionados (FORESSE; HAGAN, 1997).

Aplicações e maior informação desta técnica de modelagem podem ser obtidas nas referências: Basheer e Hajmeer (2000); Najjar, et al. (1997); Hajmeer, et al. (1997); Almeida, (2002) e Baughman e Liu (1995).

2.3.7. Modelos para descrever o efeito da temperatura.

2.3.7.1. Modelos tipo Bélehrádek

Denominado modelo raiz quadrada, por Ratkowsky e outros (1982). Este modelo descreve o efeito da temperatura na taxa de crescimento bacteriano e é expresso pela seguinte equação:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (2.31)$$

Onde 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. McMeekin e outros (1987) fizeram uma modificação do modelo de Ratkowsky e introduziram a A_w . Adams e outros (1991) incorporaram o parâmetro pH. A expressão final resultou na equação 2.32, onde todos os parâmetros mínimos são previamente definidos:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min})\sqrt{(a_w - a_{w\min})}\sqrt{(pH - pH_{\min})} \quad (2.32)$$

Esta equação é não linear e seu parâmetro pode ser estimado por procedimentos iterativos.

2.3.7.2. Modelos tipo Arrhenius

A simples forma do modelo de Arrhenius é utilizada em microbiologia preditiva, mostrada pela equação:

$$\ln k = \ln A - \frac{Ea}{RT} \quad (2.33)$$

Onde, k é a taxa de crescimento, A é o parâmetro a ser ajustado, R é a constante geral dos gases ($8,314\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T é a temperatura e Ea é a energia de ativação de reação.

2.3.7.3. Modelo tipo Davey

Davey (1989) modificou o modelo de Arrhenius para relacionar os efeitos da temperatura e atividade de água mostrada pela equação:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} + C_3a_w + C_4a_w^2 \quad (2.34)$$

Onde k, a_w e T são a taxa de crescimento atividade de água e temperatura respectivamente, e C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 são os coeficientes a serem estimados.

Davey (1991) mostrou também o uso deste modelo para descrever a duração da fase lag.

2.3.7.4. Modelos para inativação e sobrevivência

Pruitt e Kamau (1993) propuseram modelos para casos particulares mediante combinações lineares, englobando a maioria das situações de crescimento/sobrevivência dos microrganismos. Alguns desses modelos são:

Modelo de morte exponencial para duas sub-populações com diferentes sensibilidades.

$$S = fe^{-\beta_1 t} + (1-f)e^{-\beta_2 t} \quad (2.35)$$

Modelo de morte de uma população e crescimento de outra.

$$X = \frac{k}{1 + e^{-\beta \cdot (t - \tau)}} + X_{dying} \cdot e^{-\alpha \cdot t} \quad (2.36)$$

Modelo de morte de uma população, crescimento de outra e inibição de uma terceira.

$$X = n_{recover} + \frac{k - X_{recover}}{1 + e^{-\beta \cdot (t - \tau)}} + X_{dying} \cdot e^{-\alpha \cdot t} \quad (2.37)$$

Onde: S é a fração total de sobreviventes (x/x_0) no tempo t; f: fração de sobreviventes da população 1 mais sensíveis; (1-f): fração de sobreviventes da população 2; β_1 : taxa de morte específica da subpopulação 1 e β_2 : taxa de morte específica da subpopulação 2; X: população no tempo t; k: parâmetro do modelo.

logístico relacionado ao log.; X_{recover} : fração da população em recuperação; X_{dying} : fração da população em morte; α : taxa de crescimento; τ : medida de atraso térmico de inativação.

2.4. Referências Bibliográficas

1. ABRAHM, G.; DREVAY, E.; CANDAU, Y.; PIAR, G. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied Environ. Microbiology**, n.56, p.3073-3080, 1990.
2. ADAIR, C.; KILSBY, D.C.; WHITTALL, P.T. Comparison of the school field (non-linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods, **Food Microbiology**, n.6, p.7-18, 1989.
3. ADAMS, M.R.; LITTLE, C.L.; EASTER, M.C. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*, **Journal Applied Bacteriology**, n.71, p.65-71, 1991.
4. ALDRICH, C., SLATER, M. J. Neural separation – how neural networks will lead to better control and simulation of extraction columns. **The Chemical Engineer**, v.15, p.11-18, 1995.
5. ALMEIDA, J.S. Predictive non-linear modeling of complex data by artificial neural networks, **Analytical biotechnology**, n.13, p.72-76, 2002.
6. BARANYI, J.; PIN, C.; ROSS, T. Validating and comparing predictive models. **International Journal food microbiology**, n.48, p.159-166, 1999.
7. BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, **International Journal food microbiology**, n.23, 277-294, 1994.

8. BASHEER, L.A.; HAJMEER, M. Artificial neural network: fundamentals, computing, design, and application, **Journal of microbiology methods**, n.43, p.3-31, 2000.
9. BAUGHMAN, D. R.; LIU, Y. A. **Neural networks in bioprocessing and chemical engineering**. San Diego, California: Academic Press, 1995. 488p.
10. BLACKBURN, W.C., Modeling shelf-life, In: Kilcast, D.; Subramaniam, P. **The stability and shelf-life of Food**, CRC Press LLC, Cambridge, England, 2000. Cap. 3.
11. BROGHALL, J.M.; BROWN, C. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development and application of three-dimensional models to predict bacterial growth. **Food Microbiology**, n.1, p.13-22, 1984.
12. BROUGHALL, J.M.; ANSLOW, P.; KILSBY, D.C. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. **Journal Applied Bacteriol.** n.55, p.101-110, 1983.
13. BUCHANAN, R.L. Developing and distributing userfriendly application software, **Journal Industrial Microbiology**, n.12, p.251-155, 1993a.
14. BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology, **Trends food science Technol**, n.4. p.6-11, 1993.
15. 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.

16. BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; WHITING, R.C. Effect and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria Monocytogenes*, **Journal Food Protection**, n.52, p844-851, 1989.
17. DAVEY, K.R. Applicability of the Davey linear Arrhenius predictive model to the lag phase of microbial growth, **Journal Applied Bacteriol**, n.6, p.302-303, 1991.
18. DAVEY, K.R. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. **Journal Applied Bacteriology**, n.67, p.483-488, 1989.
19. DEMUTH, H.; BEALE, M. Neural Network Toolbox User's Guide for Use with MATLAB®. Version 4, Reading: Hagan, M. 2002, Backpropagation.
20. DUFFY, L.L.; VANDERLINDE, P.B.; GRAU, F.A. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and sorbate, **International journal food microbiology**, n.23, p.377-390, 1994.
21. EBERHART, C.R., DOBBINS, W.R. **Neural network PC tools**; a practical guide. San Diego, California: Academic Press, 1990. 414p.
22. FORESSE, F.D.; HAGAN, M.T. Gauss-Newton Approximation to Bayesia learning. In Proceeding of the 1997 International Joint Conference on Neural Networks. Disponível em: <<http://elec-engr.okstate.edu/mhagan/>>. Acesso em 10 Dez. 2004.
23. GENIGEORGIS, C.; MARTIN, S.; FRANTI, C.E.; RICMAN, H. Initiation of Staphylococcal growth in laboratory media. **Applied Microbiology**, n.21, p.934-939. 1971.

24. GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal Applied Bacteriology.**, n.62, p.479-490, 1987.
25. GIFFEL, M.C.; ZWIETERING, M.H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, n.46, p.135-149, 1999.
26. GRAU, F.H.; VANDERLINDE, P.B. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH, **Journal Food Protection**, n.56, p.96-101, 1993.
27. HAJMEER, M.H.; BASHEER, L.A.; NAJJAR, Y.M. Computational neural networks for predictive microbiology: II. Application to microbial growth. **International journal of food microbiology**, n.34, p.51-66, 1997.
28. HAYKIN, S. **Redes neurais** – Princípios e praticas. Porto Alegre-RS-Brasil: Bookman, 2001.
29. HILLS, B.P.; WRIGHT, K.M. A new model for bacterial growth in heterogeneous system, **J. Theor, Biol**, 168, p.31-41, 1994.
30. HOSMER, D.W.; LEWESHOW, S. **Applied logistic regression**, second edition, John Wiley & Sons, INC, New York, 2000, 375p.
31. JEYAMKONDAN, S.; JAYAS, D.S.; HOLLEY, R.A. Microbial growth modeling with artificial neural networks, **International journal of food microbiology**, n.64, p.343-354, 2001.

32. KAMAU, D.N.; DOORES, S.; PRUITT, K.M. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. **Appl. Environ. Microbiology**, n.56, p.2711-2716, 1990.
33. LEE, E.T. **Statistical methods for survival data analysis**, second edition, John Wiley & Sons, Inc, 1992, 482p.
34. LOPEZ-MALO, A.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S.M. Probabilistic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inhibition under the effects of water activity, pH, a potassium sorbate concentration. **Journal of food protection** vol.63 n.1, p.91-95, 2000.
35. LOPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Modeling the growth/no-growth interface of *Zigosaccharomyces bailli* in mango puree, **Journal of food science** v.65, n.3, p.516-520, 2000.
36. MASANA, M.O. Limitations and extensions of predictive microbiology models, M. Phil Thesis, University of Reading, 1999, IN: Blackburn, W.C., Modeling shelf-life, In: Kilcast, D.; Subramaniam, P. **The stability and shelf-life of Food**, CRC Press LLC, Cambridge, England, 2000.
37. MCCLURE, P.J.; COLE, M.B.; DAVIES, K.W. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **International Journal Food Microbiology**, n.23, p.359-375, 1994.
38. MCDONALD, K.; SUN, DA-WEN. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International journal of food microbiology**, n.52, p.1-27, 1999.

39. MCMEEKIN, T.A.; CHANDLER, R.E.; DOR, P.E.; GARLAND, C.D.; OLLEY, J.; POTROS, S.; RATKOWSKY, D.A. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xyloso*. **Journal of Applied Bacteriology**, n.62, p.543-550, 1987.
40. MCMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D.A. **Predictive microbiology: Theory and Applications**. Research studies Press, Taunt UK, 1993.
41. METAXAPOULOS, T.A.; GENIGEORGIS, C.; FANELLI, M.J.; FRANTI, C.; COSMA, E. Production of Italian dry salami, I: initiation of Staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. **Journal Food Protection**, n.44, p.347-352, 1981a.
42. METAXAPOULOS, T.A.; GENIGEORGIS, C.; FANELLI, M.J.; FRANTI, C.; COSMA, E. Production of Italian dry salami, I: effect of starter culture and chemical acidulation on Staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions, **Applied Environmental Microbiology**, n.42, p.863-871, 1981b.
43. NAJJAR, Y.M.; BASHEER, I.A.; HAJMEER, M.N. Computational neural network for predictive microbiology: I. Methodology. **International journal of food microbiology**, n.34, p.27-49, 1997.
44. NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. **Applied linear statistical model**: regression analysis of variance, experimental designs. 3ra ed. Homeword Richard, 1996, 1127p.

45. NIXON, P.A. (1971), Temperature integration as a means of assessing storage conditions In: Ross, T.; McMeekin, T.A. Predictive microbiology: Review paper, **International Journal of Food Microbiology**, n.23, p.241-246, 1994.
46. OLLEY, I.; RATKOWSKY, D.A. Temperature function integration and its importance in the storage and distribution of flesh foods above the freezing point. **Food Technol. Aust**, N.25, p.66-73, 1973a.
47. OLLEY, I.; RATKOWSKY, D.A. The role of temperature function integration in monitoring of fish spoilage. **Food Technol. N.Z.**, 8,13,15,17, 1973b.
48. PEÑA, W.L.; ASSIS, J.F.; MASSAGUER, P.R. Development of a predictive model on the growth of the spoilage mould, *Paecilomyces variotii*, in pineapple juice – the effects of water activity, pH, Natamax™, and oxygen permeability of packaging. **Fruit processing**, n.5, p.40-48, 2004.
49. PRUITT, K.M.; KAMAU, D.N. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. **Journal of Industrial Microbiology**, n.12, p.221-231, 1993
50. RATKOWSKY, D.A Nonlinear regression modeling: a unified practical approach. New York: Marcel Dekker, (1983a), In: Ratkowsky, D.A. Principles of nonlinear regression modeling, **Journal Industrial Microbiology**, n.12, p.195-199, 1993.
51. RATKOWSKY, D.A. Principles of nonlinear regression modeling, **Journal Industrial Microbiology**, n.12, p.195-199, 1993.
52. RATKOWSKY, D.A.; LOWRY, R.K.; MCMEEKIN, T.A.; STOKES, A.N.; CHANDLER, R.E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal Bacteriol.** 154, p.1222-1226, 1983.

53. RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J.; MCMEEKIN, T.A.; BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal Bacteriology**. 149, p.1-5, 1982.
54. ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology, **Journal Applied Bacteriology**, 81, p.501-508, 1996.
55. ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive modeling of the growth and survival of Listeria in fishery products, **International journal of food microbiology**, n.62, p.231-245, 2000.
56. ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. Predictive microbiology: Review paper, **International Journal of Food Microbiology**, n.23, p.241-246, 1994.
57. SABLANI, S.S., RAMASWAMY, H.S., PRASHER, S.O. A neural Network Approach for thermal processing applications, **Journal of Food Processing and Preservation**., n.19,p.283-301, 1995.
58. SKINNER, E.G.; LERKIN, J.W. Mathematical modeling of bacterial growth: a review. **Journal of food safety**, n.14, p.175-217, 1994.
59. SPENCER, R.; BAINES, C.R. Effect of temperature on the spoilage of wet fish I. Storage at constant temperature between -1°C and 55°C. **Food Technol.** N.18, p.769-772, 1964.
60. SREEKANTH, S., RAMASWAMY, H.S., SABLANI, S. Prediction of psychrometric parameters using neural networks. **Drying Technology**, v.16, n.3, p.825-837, 1998
61. STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in food processing**, chapter 5, Academic press, New York, 1965, 236p.

62. THYAGARAJAN, T., SHANMUGAN, J., PONNAVAIKKO, M., RAO, P.G. Artificial neural networks: principle and application to model based control of drying systems- a review. **Drying Technology**, v.16, n.6, p.931-966, 1998.
63. WHITING, R.C. Microbial database building: what have we learned?. **Food Technol.** 51 (4) p.82-87, 1997.
64. WHITING, R.C.; Buchanan, R.L. A classification of models in predictive microbiology – a reply to K.R. Davey. **Food microbiology**, n.10, p.175-177, 1993.
65. WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. Predictive modeling In: Doyle, M.P. Beuchat, L.R.; Montville, T.J. Food microbiology fundamentals and frontiers, Washington, ASM, 1997, P.728-739.
66. BUCHANAN, R.L. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications, **J. Food Safety**, v.11, p.123-134, 1991.
67. NEUMEYER, K.; ROSS, T.; McMEEKIN, T. Development of Pseudomonas predictor, **Aust J Dairy Technol**, v.52, p.120-122, 1997.
68. DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish, **Int J Food Microbiol**, v.26, p.305-317, 1995.
69. JONES, H.P Ambient packaged cakes. In Shelf Life Evaluation of foods, eds. Man CMD and Jones J A, London, Blackie Academic and Professional, 1994. p.179-201.
70. NICOLAI, B.M. Computer-integrated manufacturing in the food industry. In **Computerized Control System in the Food Industry**, ed Mittal G S, New York, Basel, Hong kong, 1996, P.539-583.

71. AVERY, S.M.; HUDSON, J.A.; PHILLIPS, D.M. Use of response surface models to predict bacterial growth from time/temperature histories, **Food Control**, v.7, p.121-128, 1996.
72. LOVATT, S. **Research Food System and Technology**, 1999. In: BLACKBURN, W.C., Modeling shelf-life, In: Kilcast, D.; Subramaniam, P. The stability and shelf-life of Food, CRC Press LLC, Cambridge, England, 2000.

Parte 3. Estruturação dos resultados em artigos científicos.

Os resultados experimentais foram analisados e estruturados em cinco artigos científicos da seguinte forma:

Capítulo 2: Modelagem da interface do crescimento/não-crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja como função do pH, temperatura, Brix e concentração de nisina.

Planejamento experimental: Planejamento composto central;

Variáveis estudadas: pH (3,0, 3,7, 4,4, 5,1 e 5,8); Brix (11, 13, 15, 17 e 19); temperatura (20, 28,5, 37, 45,5 e 54) e Concentração de nisina (0, 17,5,30, 52,5 e 70 IU/ml);

Modelo utilizado: Probabilístico de regressão logística, Programa: SPSS V.8,0.

Capítulo 3: Modelagem do crescimento e tempo de adaptação do *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja.

Planejamento experimental: Planejamento composto central;

Variáveis estudadas: pH (3,0, 3,7, 4,4, 5,1 e 5,8); Brix (11, 13, 15, 17 e 19); temperatura (20, 28,5, 37, 45,5 e 54) e Concentração de nisina (0, 17,5,30, 52,5 e 70 IU/ml);

Modelos utilizados:

Primários: Gompertz modificado e Baranyi & Roberts, Programa: DMFIT;

Secundário: Superfície de Resposta, Programa Statistica v. 5.0.

Capítulo 4: Influência da nisina na resistência térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco concentrado de laranja

Planejamento experimental: Fatorial completo para dois fatores;

Variáveis estudadas: temperatura (92, 95, 98 e 102°C) e concentração de nisina (0, 50, 75 e 100 IU/ml);

Modelo utilizado: polinomial quadrático, Programa SAS, v. 8,0.

Capítulo 5: Modelagem do limite de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de maçã: efeito do pH, Brix, temperatura e concentração de nisina.

Planejamento experimental: Fatorial fracionário via procedimento ProcFactex e ProcOptex do SAS v 8.0;

Variáveis estudadas: pH (3,5, 4,0 5,0 e 5,5); Brix (11, 13, 15, e 19); temperatura (25, 35, 43 e 50) e Concentração de nisina (0, 30, 50 e 70 IU/ml);

Modelo utilizado: Probabilístico de regressão logística, Programa: SPSS V.8,0.

Capítulo 6: Uso de redes neurais artificiais na modelagem da sobrevivência do *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de maçã.

Planejamento experimental: Fatorial fracionário via procedimento ProcFactex e ProcOptex do SAS v 8.0;

Variáveis estudadas: pH (3,5, 4,0 5,0 e 5,5); Brix (11, 13, 15, e 19); temperatura (25, 35, 43 e 50) e Concentração de nisina (0, 30, 50 e 70 IU/ml);

Modelos utilizados:

Polinomial quadrático, Programa SAS, v. 8,0;

Redes Neurais Artificiais, Programa Matlab, v.6.5.

Capítulo 2

Modelagem da interface do crescimento/não-crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja como função do pH, temperatura, Brix e concentração de nisina

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista
“International Journal of Food Microbiology”**

1 **Modelagem da interface do crescimento/não-crescimento de**
2 ***Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja como**
3 **função do pH, temperatura, Brix e concentração de nisina**

4
5
6
7
8 Wilmer Edgard Luera Peña¹ and Pilar Rodriguez de Massaguer²

9
10
11 *Universidade Estadual de Campinas*
12 *Faculdade de Engenharia de Alimentos*
13 *Departamento de Ciência de Alimentos*
14 *CP 6121, CEP 13083-862*
15 *Campinas, SP - Brazil*

16
17
18
19
20 ² Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food
21 Engineering, Department of Food Science Cidade Universitaria, CP 6121,
22 CEP: 13083-862. Fax: 19-32894966, Campinas, São Paulo, Brazil, E-mail
23 address: ¹edgardwil@hotmail.com, ²esteril@unicamp.br

25 **Resumo**

26 A probabilidade do crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152
27 em suco de laranja foi estudada em diferentes condições do produto. A
28 resposta do microrganismo foi monitorada por até 47 dias sob intervalos de
29 pH (3,0 a 5,8), sólidos solúveis (11 a 19°Brix), temperatura (20 a 54°C) e de
30 concentração de nisina (0 a 70IU/ml). Os dados de crescimento / não
31 crescimento foram modelados pelo modelo de regressão logística polinomial.
32 A concordância do modelo obtido foi de 96,30% indicando bom ajuste dos
33 dados observados. Os resultados mostraram rápido crescimento em
34 condições de 0 IU de nisina por ml de suco, a 35°C com pH 4,4 e 15°Brix.
35 Para 70 IU de nisina por ml não houve crescimento, por até 47 dias de
36 estocagem, a 37°C com pH 4,4. Sucos simples (11°Brix) com pHs
37 característicos entre 3,5 a 3,7 podem se manter estáveis suportando até
38 36°C de abuso de temperatura, desde que adicionado 70IU de nisina/ml,
39 estendendo sua vida de prateleira. Com probabilidade de crescimento de
40 0,05 e usando o modelo logístico, altos valores críticos de pH podem ser
41 obtidos quando 50 IU de nisina/ml, a 25°C estão presente no suco, no
42 entanto aumentando a temperatura e diminuindo a concentração de sólidos
43 solúveis, os valores críticos de pH diminuem. Conclui-se então que a adição
44 de nisina é uma opção para o controle do crescimento de *A. acidoterrestris*
45 em suco de laranja, bem como o modelo de regressão logística resultou ser
46 importante ferramenta para determinar a resposta microbiana sob valores
47 críticos das variáveis além de prever probabilidades de crescimento para as
48 diferentes condições estudadas.

49 Palavras chaves: modelagem preditiva, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, suco
50 de laranja, nisina.

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73 **1. Introdução**

74 *Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria não patogênica, formadora de
75 esporos, que foi isolada do solo de florestas e de sucos de frutas com sinais
76 de deterioração aparente (Cerny *et al.*, 1984; Pettipher *et al.*, 1997; Walls e
77 Chuyate, 1998; Splisttoesser *et al.*, 1998). Pinhatti *et al.* (1997) reportaram
78 dados de detecção de *Alicyclobacillus* em suco concentrado de laranja
79 proveniente de vários países. Tais autores sugeriram que a ocorrência de
80 *Alicyclobacillus* é incidental, requerendo uma certa combinação adequada de
81 fatores para crescimento, tais como baixo pH e altas temperaturas por longos
82 períodos de tempo. Portanto concentrações maiores do que 10^2 UFC/ml
83 deste microrganismo em alguns sucos não estão associadas
84 necessariamente com a contaminação do produto. De qualquer maneira,
85 esporos de *A. acidoterrestris* são considerados alvos importantes no controle
86 de qualidade de suco de frutas ácidas, pois eles são capazes de germinar e
87 crescer sobre amplas faixas de pH: de 2,5 a 6,0 (Cerny *et al.*, 1984;
88 Yamazaki *et al.*, 1996), de 2,5 a 5,5 (Walls e Chuyate, 1998) e ótimas entre
89 3,5 a 5,0 (Pinhatti *et al.*, 1997). A deterioração do suco é manifestada pela
90 presença de compostos fenólicos provocando “off-flavour” descrito como
91 medicinal (Walls e Chuyate, 1998; Orr *et al.*, 2000; Jensen e Whitfield, 2003).
92 Além disso, o produto contaminado pode ou não apresentar sedimentação no
93 fundo da embalagem (Walls e Chuyate, 1998). Assim, procedimentos e
94 agentes que inibam e/ou controlem a germinação com posterior crescimento
95 desta bactéria tornam-se necessários. A nisina seria uma opção, pois
96 apresenta alta estabilidade sobre condições ácidas sendo mais solúvel a pH

97 baixo (Hurs, 1981; Davies *et al.*, 1998). Não é tóxica, e mantém sua
98 estabilidade como antimicrobiano a altas temperaturas, com efeito, principal
99 sobre bactérias gram positivas formadoras de esporos (Jay, 1994).
100 Komitopoulou *et al.* (1999) estudaram o uso da nisina (Concentração Mínima
101 Inibitória - MIC) no controle da germinação dos esporos de *A. acidoterrestris*
102 em suco de laranja, maçã e toranja a temperaturas de 25 e 44°C. Por outro
103 lado Yamazaki *et al.* (2000) determinaram MIC da nisina em meio laboratorial
104 Yeast-Peptona-Glucose-Agar (mYPGA) a 46°C e pHs de 3,4 e 4,2. Em
105 ambos os estudos não foram avaliadas faixas dos fatores, contudo Yamazaki
106 *et al.* (2000) mostrou que a sensibilidade de *A. acidoterrestris* à nisina variou
107 de acordo com a linhagem e o pH do meio. Manter um produto estável, sem
108 contaminação microbiana, requer, um controle rigoroso com identificação do
109 microrganismo principal e suas respostas frente a fatores que determinam
110 sua sobrevivência e crescimento em produtos alimentícios. Assim, modelos
111 matemáticos podem ser usados para descrever tais informações e interpretar
112 o comportamento microbiano sob diferentes circunstâncias físico químicas
113 (Alavi *et al.*, 1999). Modelos preditivos podem ser usados como ferramentas
114 na indústria de alimentos quando descrevem as interações de um
115 determinado número de fatores utilizados em combinação (McClure *et al.*,
116 1994). Modelos probabilísticos baseados em regressão logística são úteis na
117 análise da descrição da interface de crescimento/não-crescimento, podendo
118 ser explorados os efeitos das condições do meio na resposta microbiana de
119 sobrevivência, crescimento e morte (Ratkowsky e Ross, 1995; Presser *at al.*,
120 1998). Regressão logística pode ser uma poderosa ferramenta de

121 modelagem microbiana, que com suficiente conhecimento das características
122 do produto e as condições de estocagem, pode estimar a probabilidade de
123 crescimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes (Lopez-Malo e
124 Palou, 2000). Aplicações desta técnica têm sido reportadas, não apenas para
125 descrever o efeito de fatores individuais na interface de crescimento/não-
126 crescimento (Lopez-Malo *et al.*, 2000), mas também como modelagem da
127 vida de prateleira do produto (Peña *et al.*, 2004).

128 Observa-se pelos dados de literatura, que germinação e crescimento de *A.*
129 *acidoterrestis* foram estudados apenas em sucos simples pronto para o
130 consumo. Porém Splittstoesser *et al.* (1994) indicaram que o crescimento
131 desta bactéria pode ser inibido quando o conteúdo de sólidos solúveis
132 exceder 18,5°Brix. Sendo assim, há necessidade de estudar o suco
133 concentrado até esses valores de sólidos solúveis com doses mínimas de
134 nisina que possam inibir o crescimento deste microrganismo.

135 Os objetivos desta pesquisa foram: 1) implementar um modelo matemático
136 baseado em regressão logística para descrever a probabilidade de
137 crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestis* em suco de laranja
138 concentrado, como resposta aos efeitos do pH, concentração de sólidos
139 solúveis (°Brix), temperatura e concentração de nisina e 2) predizer valores
140 críticos destes fatores para inibir o crescimento da respectiva bactéria.

141

142

143

144

145 **2. Material e métodos**

146 **2.1. Cepa bacteriana e meios de cultura.**

147 Foi utilizada uma cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152
148 gentilmente cedida pela Danisco Cultor.

149 Meio de esporulação: *Alicyclobacillus acidocaldarius* médium (AAM): 0,05 %
150 de $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$; 1,5 % de agar; 1,0g de Extrato de levedura; 0,2g de
151 $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,25g de $Ca Cl_2 \cdot 2 H_2O$; 0,60g de KH_2PO_4
152 1,0g de glicose; 1,0l de água esterilizado a 121°C por 15 min. O pH foi
153 ajustado para 4,0 com H_2SO_4 1N (Murakami *et al.*, 1998).

154 Meio de quantificação K: Peptona 5g; Glicose 1g; Extrato de levedura
155 2,5g; Tween-80 1g; Agar 15g; Água destilada 1l. Esterilizado a 121°C
156 por 15 minutos. O pH ajustado para 3,7 com ácido málico 25% esterilizado
157 com microfiltro de 0,22mm (Walls e Chuyate, 1998).

158

159 **2.2. Preparação da suspensão de esporos.**

160 Inicialmente foi realizada a pré-esporulação de *Alicyclobacillus acidoterrestris*
161 em 4 tubos inclinados contendo meio PDA-Oxoid (Potato Dextrose Agar, pH
162 = 5,6), incubados a 44°C por 3 dias (Pontius *et al.*, 1998). Posteriormente o
163 crescimento nos tubos foi recolhido através de raspagem com baguetas
164 estéreis de vidro utilizando 5ml de água destilada estéril por tubo. A
165 suspensão obtida foi transferida para um tubo de rosca de 25x200 mm estéril
166 e ativada a 80°C por 10 minutos, seguido de resfriamento rápido em banho
167 de gelo. Inoculou-se 0,1ml da suspensão ativada em cada uma de 100
168 garrafas de vidro de 290 ml contendo 60ml de meio (AAM) solidificado e

169 inclinado. As 100 garrafas inoculadas foram então incubadas por 9 dias a
170 45°C. Após observação microscópica de 90% do campo esporulado, via
171 coloração de esporos utilizando corante verde malaquita, foi realizada a
172 coleta dos esporos (Murakami *et al.*, 1998).

173 Os esporos coletados foram lavados, e re-suspendidos em água destilada
174 estéril após 3 centrifugações (12310g por 15 min a 4°C), seguido de
175 lavagens sucessivas. Após a primeira lavagem adicionou-se 0,3mg de
176 lisozima/ml de suspensão ajustando o pH até 11 para eliminação das células
177 vegetativas (Stumbo, 1965). Os esporos foram estocados a 4°C em água
178 destilada estéril até seu uso.

179 A contagem foi feita em meio K, após ativação térmica por 10 minutos a
180 80°C, com plaqueamento em profundidade. As placas invertidas foram
181 incubadas a 43°C por 5 dias. A concentração da suspensão de esporos foi
182 de 8×10^8 esporos/ml (Walls e Chuyate, 1998).

183

184 **2.3 Matéria prima**

185 Foi utilizado suco concentrado de laranja (66°Brix com pH 3,68) como
186 matéria prima na preparação das amostras; realizando-se as seguintes
187 análises microbiológicas com o propósito de verificar a qualidade do suco.

- 188 • Contagem total de mesófilos (Vanderzant e Splittstoesser, 1992)

189 Foram preparadas diluições seriadas de 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} , e plaquedas em
190 profundidade em meio PCA-Agar padrão para contagem (Difco), pH 7,0,

191 em duplicata e incubadas a 30°C por 24/48 horas e o resultado expresso
192 em UFC/ml.

193 • Contagem de bolores e leveduras (Vanderzant e Splittstoesser, 1992).
194 Diluições seriadas de 10⁰, 10⁻¹ e 10⁻² em água peptonada estéril (0,1%)
195 foi realizad plaqueamento em profundidade com meio PDA (Oxoid Ltd,
196 Inglaterra) acidificado para pH 3,5 com ácido tartárico 10% (p/v). As
197 placas invertidas em duplicata foram incubadas a 30°C por 3-5 dias, e o
198 resultado final expresso em UFC/ml de suco concentrado.

199 • Contagem de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, em meio K (pH
200 3,7), após choque térmico de 80°C por 10min, seguindo o procedimento
201 de Walls e Chuyate (1998).

202

203 **2.4. Determinação da concentração máxima de nisina a ser utilizada.**

204 Inicialmente realizou-se um teste de determinação da concentração máxima
205 de nisina a ser usada no experimento em IU/ml, nas condições ótimas de
206 crescimento da bactéria. Para tanto foram testados 100; 80; 70; 50; 25; 12,5;
207 6,25 e 0 IU nisina/ml de suco, com pH 4, 11,5⁰Brix e temperatura de
208 incubação de 43⁰C por um período de 6 dias (Komitopoulou *et al.*, 1999). O
209 plaqueamento foi realizado diariamente em meio K (pH 3,7) e incubado a
210 43⁰C por 3-5 dias. A concentração do inóculo foi da ordem de
211 7x10⁵esporos/ml de suco, ativados a 80⁰C por 10min.

212

213

214

215 **2.5. Planejamento experimental.**

216 Uma vez determinada a concentração máxima de nisina a ser empregada no
217 experimento, foi implementado um planejamento composto central: 2⁴
218 (ensaios 1 ao 16) com 3 pontos centrais (ensaios 25 ao 27) e 8 pontos axiais
219 (ensaios 17 ao 24) como apresentado na Tabela 1 (Neto et al., 2002). Os
220 intervalos dos fatores foram: pH (3 a 5,8), Temperatura (20 a 54°C), °Brix (11
221 a 19) e concentração de nisina (0 a 70IU/ml); sendo a variável resposta o
222 crescimento ou não do microrganismo. Temperatura, °Brix e pH foram
223 estabelecidos considerando as condições de crescimento do *A.*
224 *acidoterrestis*. O pH do suco de laranja foi ajustado com NaOH 5N e ácido
225 málico 25% (p/v) e medido com um potenciômetro (DMPH-2-Digimed). As
226 diferentes concentrações de sólidos solúveis do suco foram ajustadas com
227 diferentes diluições de água destilada estéril adicionada no suco concentrado
228 de laranja. Para medição foi utilizado um refratômetro ATAGO HSRO500.
229 Todas as amostras de concentrado foram tratadas termicamente a 105°C por
230 10 min para eliminar presença de possíveis competidores (Massaguer et al.,
231 2002). A NisinaTM foi cedida pela Danisco Cultor e usada após preparo de
232 uma solução estoque contendo 10⁴ IU/ml em HCl 0,02 N e esterilizada as
233 121°C durante 15 minutos (Scott e Taylor, 1981). A carga inicial inoculada de
234 *A. acidoterrestis* CRA 7152 foi de 2,0x10² esporos/ml de suco de laranja,
235 ativados a 80°C por 10min, simulando a carga comumente reportada em
236 concentrado de laranja (Pinhatti et al. 1997). Cada ensaio foi realizado em
237 duplicata e incubado por um período de até 47 dias.

238

Tabela 1

239 **2.6. Avaliação do crescimento e não crescimento.**

240 Todos os ensaios foram monitorados diariamente via plaqueamento em meio
241 K (pH 3,7) e as placas incubadas a 43°C por 3 - 5 dias. Classificaram-se os
242 ensaios como positivos para crescimento, quando o número de contagem de
243 células nas placas foi maior que o número de esporos ativados inoculados no
244 tempo zero; caso contrário foram classificados como negativos. Este critério
245 também foi usado por Lopez-Malo e Palou (2000). Assim, as respostas de
246 crescimento/não-crescimento foram analisadas através da modelagem
247 probabilística.

248

249 **2.7. Modelo Probabilístico de Regressão logística.**

250 As respostas de crescimento/não crescimento obtidas nos diferentes ensaios
251 da Tabela 1 foram ajustadas usando o modelo de regressão logística que
252 descreveu a probabilidade de crescimento da bactéria condicionado à
253 combinação dos vários fatores estudados. O modelo de regressão logística
254 descreve a probabilidade de um determinado evento Y ocorrer, condicionado
255 a um vetor X. Segue o modelo específico de regressão logística (Hosmer e
256 Lemjeshow, 2000)

257
$$P(x) = \frac{\exp\left[\sum \beta_i x_i\right]}{1 + \exp\left[\sum \beta_i x_i\right]} \quad (1)$$

258 Onde $P(x)$ é a probabilidade de crescimento ou não crescimento

259 A transformação logit de $P(x)$ é definida como:

260
$$\text{Logit}(P) = g(x) = \text{Ln} \left[\frac{p(x)}{1-p(x)} \right] = \sum \beta_i x_i \quad (2)$$

261 Nesta pesquisa, °Brix, pH, concentração de nisina e temperatura de
 262 incubação foram as variáveis independentes, sendo a variável dependente a
 263 probabilidade do *A. acidoterrestris* crescer no suco concentrado. Essa
 264 resposta foi qualificada como “1” para crescimento e “0” para não-
 265 crescimento sobre as condições avaliadas. Assim o seguinte modelo $\text{logit}(P)$
 266 foi escolhido:

267
$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 \text{pH} + \beta_2 \text{Ni} + \beta_3 \text{T} + \beta_5 \text{Brix} + \beta_6 \text{pH.Ni} + \beta_7 \text{pH.T} + \beta_8 \text{pH.Brix} + \beta_9 \text{Ni.T} + \beta_{10} \text{Ni.Brix} + \beta_{11} \text{T.Brix} \quad (3)$$

268 Onde os $\beta_0, \dots, \beta_{11}$ são os coeficientes do modelo que foram estimados pelo
 269 ajuste dos dados experimentais com probabilidade de 0,05, Ni
 270 =concentração de nisina em IU/ml, T = temperatura em °C e °Brix =
 271 concentração de sólidos solúveis. Para tanto se utilizou o procedimento de
 272 regressão logística do programa SPSS 8.0.

273 Depois de ajustado o modelo de regressão logística, predições de interface
 274 de crescimento /não crescimento foram realizadas com probabilidade de
 275 0,05% pela substituição do valor de logito ($p(x)$) no modelo da equação 1,
 276 sendo calculado o valor de uma variável independente mantendo as outras
 277 variáveis independentes fixas. Também foram calculadas probabilidades de
 278 crescimento usando a equação logística para as condições estudadas.

279

280

281 **3. Resultados e Discussão**

282 **3.1. Caracterização microbiológica da matéria prima**

283 A Tabela 2 apresenta as características do suco concentrado que foi utilizado
284 no experimento. Em conclusão o suco apresentou-se como um bom produto
285 para ser utilizado enquanto substrato, estando livre de esporos de
286 *Alicyclobacillus*.

287 Tabela 2

288

289 **3.2. Concentração máxima de nisina para inibição do *A. acidoterrestris***
290 **CRA 7152 em suco de laranja.**

291 Observa-se pela Figura 1 que houve crescimento para o controle (0), 6,25,
292 12,5, e 25 IU de nisina/ml indicado pelo aumento da população inicialmente
293 inoculada. Para 100, 80 e 70IU/ml, o efeito da nisina manifestou-se pela
294 redução da população microbiana em, pelo menos, um ciclo log. No caso da
295 concentração de 50 IU/ml foi observado um estado de latência da bactéria,
296 pois a mesma não cresceu; no entanto não houve uma redução significativa
297 da população inicial, e após 5 dias apresentou leve tendência ao
298 crescimento. Com 100IU de nisina/ml foi obtida a maior inibição da bactéria
299 (até 2 ciclos logarítmicos). Os resultados encontrados concordaram como os
300 reportados por Yamazaki *et al.* (2000) para meio laboratorial e Komitopoulou
301 *et al.* (1999) para suco de laranja simples. Com 70IU de nisina/ml observou-
302 se clara inibição do crescimento bacteriano mesmo sem redução da
303 população inoculada. Desta forma é possível concluir que uma faixa de 0–70

304 IU nisina/ml pode causar certo grau de inibição interagindo com os outros
305 fatores, sem necessidade de exceder a dose da bacteriocina.

306 Figura 1

307

308 **3.3. Crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco** 309 **de laranja**

310 Pela Tabela 3 observou-se crescimento em ausência de nisina, ensaio 21,
311 (37°C, pH 4,4; 0 IU/ml de nisina e 15°Brix) em apenas 1 dia de incubação,
312 com população final atingindo nível de 10⁷ UFC/ml de suco em 7 dias. Isto
313 mostra que em condições de abuso de temperatura (≥37°C) ou em climas
314 tropicais haverá rápida deterioração do produto pelo desenvolvimento desta
315 bactéria em apenas 24 horas reforçando a necessidade de refrigeração
316 adequada. Walls e Chuyate (1998) observaram rápido crescimento em
317 temperaturas de 35 a 46°C associadas a pHs de 4,5 a 5. Por outro lado
318 Pinhatti *et al.* (1997) mostraram pHs ótimos de crescimento para
319 *Alicyclobacillus* entre 3,5 a 5.

320 Tabela 3

321 A 45,5°C de incubação, região de temperatura ótima (Cerny *et al.* 2000) e
322 qualquer condição dos valores testados de pH, °Brix e nisina houve aumento
323 da população microbiana, com exceção do ensaio 14 (pH 3,7, nisina 52,5
324 IU/ml e 17°Brix). Em todos esses ensaios acredita-se que a temperatura
325 elevada foi o fator mais importante para obter respostas positivas, “1”, de
326 crescimento afetando a retenção da atividade da bacteriocina. Delves-

327 Broughton (1990) estudou a retenção da atividade da nisina em queijo
328 durante a estocagem a 20, 25 e 30°C, mostrando que as perdas foram mais
329 pronunciadas a temperatura e pH mais altos. Para o ensaio 14, tanto a
330 influência da alta concentração de nisina associada a uma alta concentração
331 de sólidos solúveis (baixa atividade de água) foram determinantes para a não
332 ocorrência do aumento da população microbiana sendo, portanto, qualificado
333 como “0”. Komitopoulou *et al.* (1999) mostraram que com 50IU de nisina /ml
334 em suco de laranja simples ocorreu pouco crescimento com
335 aproximadamente o dobro da carga inoculada inicialmente durante 6 dias de
336 incubação a 44°C. Porém nesta pesquisa foi possível obter inibição com
337 52,5IU/ml de suco, pH 3,7 e 17°Brix por até 47 dias incubados a 45,5°C. Tal
338 resultado é relevante para casos de transporte de suco de laranja em
339 condições de temperatura de abuso de até 45,5°C.

340 O forte efeito de temperatura é observado no caso das amostras incubadas a
341 28,5°C pois houve crescimento apenas nos ensaios 3 (pH 5,1 Nisina 17,5
342 IU/ml e 13° Brix) e 11 (pH 5,1 Nisina 17,5 IU/ml e 17°Brix), com populações
343 finais muito baixas, conseguindo apenas duplicar a carga inicialmente
344 inoculada. Nestes ensaios o valor do pH de 5,1 diminuiu a atividade inibitória
345 da nisina favorecendo desta maneira o crescimento da bactéria. Delves-
346 Broughton (1990) indicou que, perda da atividade da nisina é mais
347 pronunciada a altos valores de pH. Sob outro enfoque vários autores
348 (Pettipher *et al.*, 1997; Walls e Chuyate, 2000; Eguchi *et al.*, 2001) indicaram
349 temperaturas mínimas de crescimento entre 20 a 25°C. Porém, diferentes

350 combinações de pH, concentração de nisina relativamente baixa e °Brix
351 resultaram ser inibitórias a 28,5°C durante 47 dias de incubação.

352 Nos ensaios que representaram os pontos axiais (ensaios 17 a 24), houve
353 crescimento apenas nos ensaios 20 (37°C, pH 5,8, nisina 35 IU/ml, 15°Brix);
354 21 (37°C, pH 4,4, nisina 0 IU/ml, 15°Brix) e 23 (37°C, pH 4,4 nisina 35 IU/ml,
355 11°Brix). No caso do ensaio 21 o efeito do pH, temperatura ótima e ausência
356 de nisina, provocaram crescimento. Em relação aos pontos axiais 17 (20°C,
357 pH 4,4, nisina 35IU/ml, 15°Brix); 18 (54°C, pH 4,4, nisina 35 IU/ml, 15°Brix);
358 19 (37°C, pH 3, nisina 35 IU/ml, 15°Brix); 22 (37°C, pH 4,4 , nisina 70IU/ml,
359 15°Brix) e 24 (37°C, pH 4,4 nisina 35 IU/ml, 19°Brix), cada fator no seu valor
360 extremo foi determinante para não permitir o aumento da população
361 bacteriana que foram qualificadas como “0”. Já para as amostras que
362 representaram os pontos centrais (ensaios 25 a 27 com condições mais
363 favoráveis ao crescimento) houve crescimento positivo “1” no tempo
364 incubado.

365

366 **3.4. Modelagem probabilística.**

367 Utilizando os resultados de crescimento / não crescimento no concentrado de
368 laranja após 47 dias de incubação, foi ajustado um modelo de regressão
369 logística, para descrever a probabilidade de crescimento (p(cresc)) da
370 bactéria como resposta à influência dos fatores pH, concentração de nisina,
371 Temperatura e °Brix.

372 O ajuste dos dados da Tabela 3 à equação 3 por regressão logística com
373 eliminação dos coeficientes não significativos ($p > 0,05$) estão mostrados na
374 Tabela 4. Através de uma análise de fatores individuais observou-se que
375 apenas a variável °Brix, isoladamente, não afetou os resultados, porém sua
376 interação com a temperatura sim. A análise de regressão confirmou que os
377 outros fatores (T, pH, e concentração de nisina) foram altamente
378 significativos.

379 Tabela 4

380 A classificação da correta porcentagem ajustada pelo modelo mostrou que
381 96,30% dos dados foram classificados adequadamente pelo modelo, com
382 apenas 2 casos classificados equivocadamente, que foram preditos como
383 crescimento, porém observados como não crescimento experimentalmente.
384 A predição dos dados com crescimento ('1') foi 100% correta. O bom ajuste
385 do modelo foi testado pelo teste de chi-quadrado e a razão de
386 verossemelhança (Tabela 5).

387 Tabela 5

388 Modelos microbianos probabilísticos baseados em regressão logística foram
389 reportados por vários autores para *Listeria monocytogenes* (Bolton and
390 Frank, 1999), *Shigella flexneri* (Ratkowsky and Ross, 1995), *Saccharomyces*
391 *cerevisiae* (Lopez-Malo *et al.*, 2000), mostrando a flexibilidade na construção
392 do modelo logístico. Podendo introduzir no modelo, modelos cinéticos como
393 raiz quadrada (Ratkowsky e Ross, 1995; Lanciotti *et al.*, 2001) ou modelos
394 como polinomial (Lopez-malo e Palou, 2000; Peña *et al.*, 2004). Entretanto,

395 em cada caso de crescimento/não crescimento é preciso fixar um tempo de
396 incubação adequado para avaliar estas respostas microbianas.

397 O modelo probabilístico implementado resultou na equação 4.

398

$$399 P(\text{cresc}) = \frac{\exp(-14,4125 + 0,4202 * T + 2,4888 \text{ pH} - 0,1006 * Ni \sin a - 0,0144 \text{ Brix} * T)}{(1 + \exp(-14,4125 + 0,4202 * T + 2,4888 \text{ pH} - 0,1006 * Ni \sin a - 0,0144 \text{ Brix} * T))} \quad (4)$$

400

401 Utilizando o modelo da equação 4 foram previstas as probabilidades de
402 crescimento do *A. acidoterrestris* (valores entre 0 e 1), para diferentes
403 combinações de pH, temperatura, °Brix e concentração de nisina
404 apresentadas nas Tabelas 6 a 8. Estes dados são de grande interesse para a
405 indústria de sucos.

406 Para sucos de laranja com pH 3,0 (Tabela 6), as probabilidades de
407 crescimento foram bem pequenas (menores que 0,005) como esperado para
408 70IU de nisina em suco com 17°Brix até temperatura de incubação de 48°C.

409 A medida que a concentração de sólidos solúveis e concentração de nisina
410 diminuíram, essa probabilidade aumentou mas o mesmo não aconteceu com
411 a temperatura que contrariamente obtiveram-se probabilidades de
412 crescimento mais baixas a medida que esta foi diminuindo. Assim, com suco
413 simples de pH 3,0, 40IU/ml e 60IU/ml de nisina é possível ter um abuso de
414 temperatura de até 31°C e 38°C, respectivamente, a uma probabilidade de
415 crescimento de 0,05. A medida que diminuiu-se a concentração de nisina foi
416 necessário diminuir a temperatura para manter baixos níveis de
417 probabilidade de crescimento.

418 Com suco simples (11°Brix) e pHs entre 3,5 e 3,7 o modelo indica que
419 podem ser obtidas probabilidades de não-crescimento ($\geq 0,95$), apenas com
420 concentração de nisina de 70IU/ml, podendo ter temperaturas de abuso de
421 incubação de até 36°C (Tabelas 7 e 8). Manter essas probabilidades de não-
422 crescimento com diminuição da concentração de nisina implica diminuição da
423 temperatura de incubação. Assim um suco simples com pH 3,7 e 60IU/ml
424 poderá ser armazenado a uma temperatura máxima de 32°C. Isto demonstra
425 que, havendo contaminação do suco por *Alicyclobacillus* em níveis de
426 10^2 esporos/ml, a deterioração só poderá ser prevenida adicionando diversas
427 concentrações de nisina com controle rigoroso da temperatura de transporte
428 ou armazenamento refrigerado. Observa-se, porém, que o modelo
429 encontrado prediz essas probabilidades para um tempo de vida de prateleira
430 de 47 dias de estocagem nas diferentes condições dos fatores, na prática
431 isto deverá ser evitado principalmente nas condições de temperatura de
432 abuso. Longos períodos de exposição, a essas temperaturas, acarretarão
433 aumento da probabilidade de crescimento da bactéria e conseqüente
434 deterioração do produto. Uma aplicação balanceada destes fatores de
435 preservação (pH, Brix, e temperatura) permitirá a redução da probabilidade
436 de crescimento do *A. acidoterrestris* garantindo uma vida de prateleira
437 microbiologicamente estável para o produto final.

438 As Figuras 2 e 3 constituem as superfícies de algumas das condições
439 ensaiadas, observando-se claramente o efeito das variáveis em estudo sobre
440 a probabilidade de crescimento do *A. acidoterrestris* em suco de laranja. Na
441 figura 3(a) o modelo sugere crescimento com probabilidades baixas de no

442 máximo 0,5 para sucos com 11°Brix e temperatura de incubação de 20°C.
443 Este nível de probabilidade pode ser diminuído para 0,05 quando adicionado
444 20 a 30IU/ml de nisina no suco. Isto é importante, pois embora a literatura
445 reporta temperaturas mínimas de crescimento entre 20 a 25°C, dependendo
446 da cepa, o modelo estaria predizendo do lado seguro.

447 Tabela 6

448 Tabela 7

449 Tabela 8

450 Figura 2

451 Figura 3

452 As Tabelas 9 a 11 mostram os valores críticos (valores a partir dos quais
453 pode ocorrer inibição ou crescimento do microrganismo a um determinado
454 valor de probabilidade) preditos pelo modelo da equação 4 para os diferentes
455 fatores estudados. Assim pela Tabela 9 observamos que com 20IU de
456 nisina/ml a 20°C, o valor de pH crítico seria 3,3 para sucos com 11°Brix.
457 Aumentando a concentração de sólidos solúveis para 15 e 17Brix e
458 mantendo a mesma condição de temperatura, o valor mínimo de pH passaria
459 para 3,8 e 4,0 respectivamente, ou seja, haveria maior tolerância deste fator
460 para inibir o crescimento da bactéria. A medida que a concentração de nisina
461 aumenta, o valor mínimo de pH também aumenta. Assim pode ter-se valores
462 mínimos de pH de até 4,5 com 50IU/ml incubados a 20, 25 e 30°C para
463 sucos com 11, 15 e 17°Brix respectivamente. Informação importante no caso
464 de utilização de matéria prima com diferentes graus de maturação e na
465 preparação de misturas de sucos de diferentes variedades. Para temperatura

466 ambiente entre 25 e 35°C com 50IU/ml de nisina, valores críticos de pH
467 ficaram em 2,9 a 4,0; 3,8 a 4,6 e 4,2 a 4,9 para sucos com 11, 15 e 17°Brix
468 respectivamente. No caso das temperaturas críticas (valor de temperatura a
469 partir da qual poderá ocorrer crescimento) com probabilidade de 0,05 (Tabela
470 10), observa-se que podem ser obtidos amplos valores de tolerância a
471 medida que a concentração de nisina aumenta. Para sucos com pH de 3,5 a
472 4 e 50IU/ml de nisina, temperaturas máximas podem ser toleradas de 37 a
473 44, 31,8 a 37,9 e 24,8 a 29,6 para sucos com 17, 15 e 11°Brix
474 respectivamente. Para suco com 11°Brix, pH 3,7 e 50IU/ml de nisina a
475 temperatura de 27,7°C torna-se crítica para controlar o crescimento, com
476 tolerância maior que 35,3°C quando 70IU/ml for empregado. A Tabela 11
477 mostra os valores críticos necessários de concentração de nisina
478 (concentrações mínimas para inibir crescimento da bactéria) com 0,05 de
479 probabilidade de crescimento de *A. acidoterrestis*. Observa-se que estes
480 valores mínimos podem ser obtidos dependendo da temperatura de
481 incubação e do pH utilizados. Assim para sucos com 17°Brix e pH 3,0, 3,9IU
482 de nisina/ml será necessário para evitar o crescimento da bactéria a 30°C, já
483 para 45°C de incubação, 25,7IU/ml terá de ser adicionado no produto. Suco
484 com 11°Brix e pH 3,7 requererá 29,5IU/ml de nisina quando incubado a 20°C
485 e 68,5IU/ml para 35°C; já para 25 e 30°C serão necessárias 42,5 e 55,5IU/ml
486 de nisina respectivamente; embora a Mínima Concentração Inibitória
487 calculada por Komotopoulou *et al.* (1999) foi estabelecida em 100IU/ml. Esta
488 pesquisa mostrou que quantidades menores podem ser usadas em

489 combinação com os outros fatores para causar inibição da bactéria com
490 probabilidade de 0,95.

491 Tabela 9

492 Tabela 10

493 Tabela 11

494 Modelos preditivos podem fornecer grande suporte de decisão nas diferentes
495 áreas relevantes da indústria de alimentos. Na prática, a relação que modela
496 a interface de crescimento/não crescimento fornece descrições exatas de
497 circunstâncias que podem ser aplicadas no controle de um processo ou para
498 especificar uma formulação que assegure ausência de patogênicos ou
499 deteriorantes que possam vir a se desenvolver. Como reportado por
500 McMeekin *et al.* (2000) esta técnica oferece um mecanismo de como
501 estabelecer limites das variáveis em estudo que o processador deve levar em
502 consideração. Conhecendo esta região é possível também estudar o
503 mecanismo fisiológico para qualquer lado da interface. Pois é de se esperar
504 que muitos dos acontecimentos que ocorram na interface possam ter
505 respostas invertidas.

506 Dados de modelagem preditiva em suco de laranja para inibir o crescimento
507 de *A. acidoterrestris* como função de fatores intrínsecos e extrínsecos, não
508 se encontram na literatura, sendo este trabalho pioneiro e seus resultados de
509 grande importância para a indústria brasileira de sucos.

510

511

512

513 **4. Conclusão**

- 514 • O uso da nisina é uma opção para o controle do crescimento do
515 *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja;
- 516 • 100 IU de nisina/ml foram suficientes para causar inibição com redução
517 da população *A. acidoterrestris* CRA 7152 de até 2 ciclos logarítmicos.
518 Porém quando usada em combinação com outros fatores como Brix,
519 temperatura e pH, concentrações menores podem ser utilizadas;
- 520 • Sucos simples (11°Brix) com pHs característicos entre 3,5 a 3,7 podem se
521 manter estáveis suportando até 36°C de abuso de temperatura, desde
522 que adicionados 70IU de nisina/ml, estendendo desta maneira a sua vida
523 de prateleira por até 47 dias;
- 524 • O modelo probabilístico de regressão logística resultou ser uma
525 importante ferramenta para determinar a resposta microbiana em valores
526 críticos dos fatores, assim como prever probabilidades de crescimento
527 para as diferentes combinações das variáveis estudadas;
- 528 • Valores críticos de pH, temperatura podem ser estabelecidos para
529 diminuir a quantidade de nisina no suco permitindo a inibição da bactéria.

530

531 **Agradecimentos**

532 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp pelo
533 apoio financeiro. A Indústria SucoRico S.A. pelo fornecimento das amostras
534 de suco concentrado de laranja. A Danisco Cultor do Brasil pelo fornecimento

535 da nisina. A Viviane Guerra e Professora Maria Isabel Rodrigues pelas
536 sugestões ao auxílio na análise estatística.

537

538 **Referências bibliográficas.**

539 Alavi, S.H., Peri, V.M., Knabel, S.J., Mohtar, R.H., Whiting, R.C., 1999.
540 Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria*
541 *monocytogenes* in fluid whole milk. Journal of food protection. 62, 170-176.

542 Bolton, L.F., Frank, J.F., 1999. Defining the growth /no-growth interface for
543 *Listeria monocytogenes* in Mexican style chesse based on salt, pH, and
544 moisture content. Journal Food Protection, 62 (6), 601-609.

545 Cerny, G., Duong, H.A., Wennlich, W., Miller, S., 2000. *Alicyclobacillus*
546 *acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. Food
547 Australia, 52(7), 289-291.

548 Cerny, G., Hennlich, W., Poralla, K., 1984. Spoilage of fruit juice by bacilli:
549 Isolation and characterization of the spoiling microorganism. Z. Lebens.
550 Unters. Forsch. 179, 224-227.

551 Davies, E.A., Beviss, H.E., Potter, R., Harris, J., Williams, G.C., Delves–
552 Broughton, J., 1998. Research note: the effect of ph on the stability of nisin
553 solution during autoclaving. Letters Applied microbiology, 27, 186-187.

554 Delves-Broughton, J., 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food
555 Technol. 44(11), 100-117.

556 Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., Pinhatti, E.A., Variane, S.F., 2001.
557 Acidothermophilic sporeforming bactéria (ATSB) in orange juices: Detection

558 Methods, Ecology, and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices-
559 Report of the research project-part III. Fruit Processing, 3, 95-101.

560 Hosmer, D.W., Leweshow, S., 2000. Applied logistic regression, Second
561 edition, John Wiley & Sons, INC, New York, pp.375.

562 Hurst, A., 1981. Nisin Adv Applied Microbiology, 27, 85-123.

563 Jay, J.M., 1994. Microbiologia moderna de los alimentos, Ed. Acribia,
564 Zaragoza España, pp.325-326.

565 Jensen, N., Whitfield, F.B., 2003. Role of *Alicyclobacillos acidoterrestris* in the
566 development of a disinfectant taint shelf-stable fruit juice. Letters in Applied
567 microbiology, 36, 9-14.

568 Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams,
569 M.R., 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by
570 nisin. J. Food Sci. and Technol, 34, 81–85.

571 Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L., Guerzoni, M.E., 2001.
572 Growth/no growth interface of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and
573 *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH,
574 temperature and ethanol concentration. Food microbiology, 18, 659-668.

575 Lopez–Malo, A., Guerrero, S., Alzamora, S.M., 2000. Probabilistic modeling
576 of *Saccharomyces cerevisiae* inhibition under the effects of water activity, ph
577 and potassium sorbate concentration. Journal of food protection, 63(1), 91-
578 95.

579 Lopez-Malo, A., Palou, E., 2000. Modeling the growth/no-growth interface of
580 *Zigosaccharomyces bailli* in mango puree. Journal of food science, 65(3),
581 516-520.

582 Massaguer, P.R., Pacheco, P.C., Atarassi, M.M., Peña, W.L., Gonçalves,
583 A.C., Paula, N.A., Geraldini, L.H., Liossi, L.L., Gagliazzi, M.R., Guerra, V.A.
584 2002. Sensibility and Specifity of Methods for Alicyclobacillus Detection and
585 Quantification: A collaborative study. Fruit Processing, 11, 478-482.

586 McClure, P.J., Cole, M.B., Davies, K.W., 1994. An example of stages in the
587 development of a predictive mathematical model for microbial growth: the
588 effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*.
589 International J. Food Midrobiology, 23, 359-375.

590 McMeekin, T.A., Presser, K., Ratkowsky, D., Ross, T., Salter, M.,
591 Tienungoon, S., 2000. Quantifying the hurdle concept by modeling the
592 bacterial growth/no growth interface. International Journal Food Microbiology,
593 55, 93-98.

594 Murakami, M., Tedzuka, H., Yamazaki, K. (1998). Thermal resistance of
595 *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. Food
596 Microbiology, 15, 577-582.

597 Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., 2002. Como fazer experimentos
598 segunda edição, Editora Unicamp, Pp.401.

599 Orr, R.V., Shewfelt, R.L., Huang, J.C., Tefera, S. Beuchat, L.R., 2000.
600 Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple
601 juice by sensory and chromatographic analyses and comparison with spore
602 and vegetative cell populations. Journal of food protection, 63(11), 1517-
603 1522.

604 Peña, W.L., Faria, J.A., Massaguer, P.R., 2004. Development of a predictive
605 model on the growth of the spoilage mould, *Paecilomyces variotii*, in
606 pineapple juice. *Fruit processing*, 6, 420-426.

607 Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., Murphy, J.M., 1997. Methods for the
608 detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation
609 of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks.
610 *Lett. Appl. Microbiol*, 24, 185-189.

611 Pinhatti, M.E.M.C., Variani, S., Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., 1997. Detection of
612 *Acidothermophilic bacilli* in industrialized fruit juices. *Fruit processing*, 9, 350-
613 353.

614 Pontius, A.J., Rushing, J.E., Foegeding, P.M. (1998). Heat resistance of
615 *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and
616 organic acids. *Journal of food protection*, 16(1), 41-46.

617 Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1998. Modelling the growth limits
618 (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature,
619 pH, lactic acid concentration and water activity. *Applied and Environmental*
620 *microbiology*, 5, 1773-1779.

621 Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1995. Modelling the bacterial growth/no growth
622 interface. *Letters in Applied Microbiology*, 20, 29-33.

623 Scott, V.N., Taylor, S.L., 1981. Temperature, pH and spore load effects on
624 the ability of nisin to prevent the outgrowth of *C. botulinum* spores. *Journal of*
625 *food science*, 46, 121-125.

626 Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., Churey, J.J., 1998. Control of *Alicyclobacillus*
627 in the juice industry. *Dairy food and environmental sanitation*, 18(9), 585-587.

628 Splittstoesser, D.F.; Churey, J.J., Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of
629 aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. Journal of food
630 protection, 57(12), 1080-1083.

631 Stumbo, C.R., 1965. Thermobacteriology in food processing, Academic
632 press, New york, pp.236.

633 Vanderzant, C, Splittstoesser, D.F., 1992. Compendium of methods for the
634 microbiological examination of foods. Washington DC. American Public
635 Health Association, pp.1219.

636 Walls, I., Chuyate, R., 1998. Alicyclobacillus-historical perspective and
637 preliminary characterization study. Dairy food and environmental sanitization,
638 18(8), 495-503.

639 Walls, I., Chuyate, R., 2000. Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus*
640 *acidoterrestris*. Food Australia, 527, 286-288.

641 Yamazaki, K., Murakami, M., Kawi, Y., Inoue, N., Matsuda, T., 2000. Use of
642 nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food
643 microbiology, 17, 315–320.

644 Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H., 1996. Isolation and identification of
645 *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Biosc. Biotech.
646 Biochem. 60(3), 543-545.

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661 Figura 1. Efeito inibitório da nisina sobre o *A. acidoterrestris* CRA 7152 em
662 suco de laranja 11,5⁰Brix e pH 4 a 43⁰C.

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

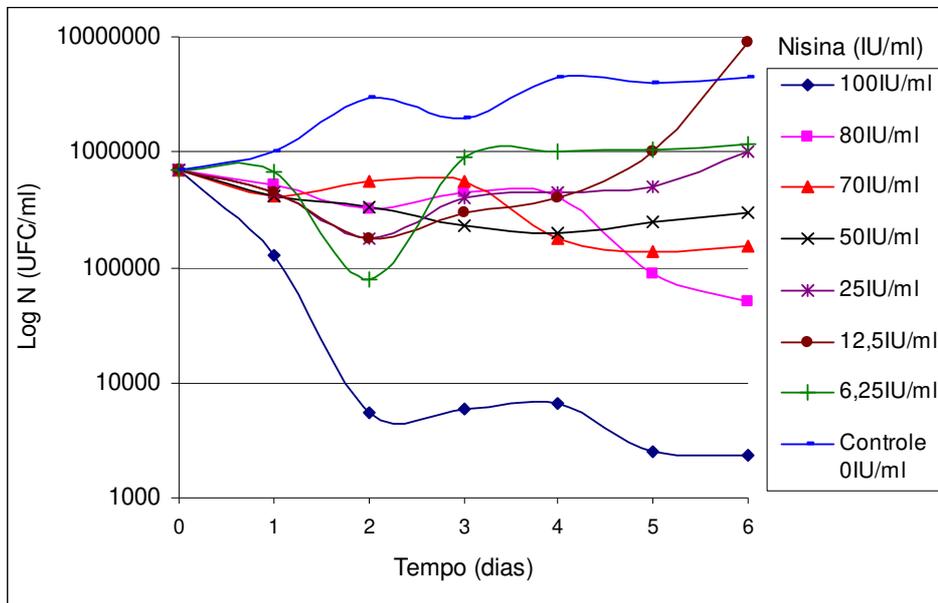
677

678

679

680

681



682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701 Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724 Figura 2. Probabilidade de crescimento do *A. acidoterrestris* CRA 7152 em
725 suco de laranja como função da temperatura de incubação e Brix: pH 3,7. (a)
726 0 nisina, (b) 50IU nisina.

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

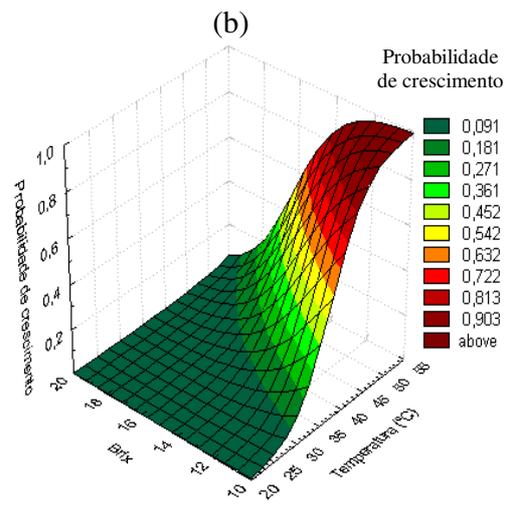
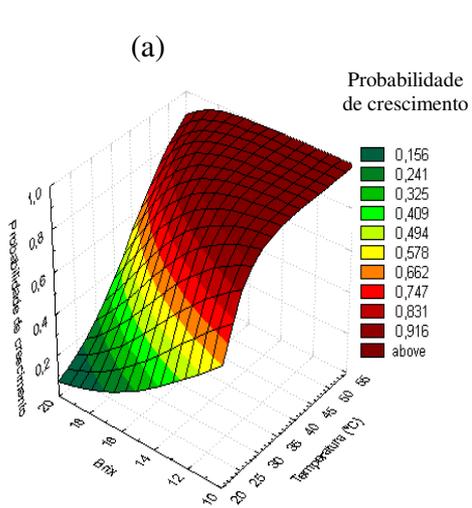
742

743

744

745

746



747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766 Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

767

768

769

770

771

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789 Figura 3. Probabilidade de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em
790 suco de laranja como função do °Brix e concentração de Nisina: pH 3,7. (a)
791 20°C, (b) 30°C.

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

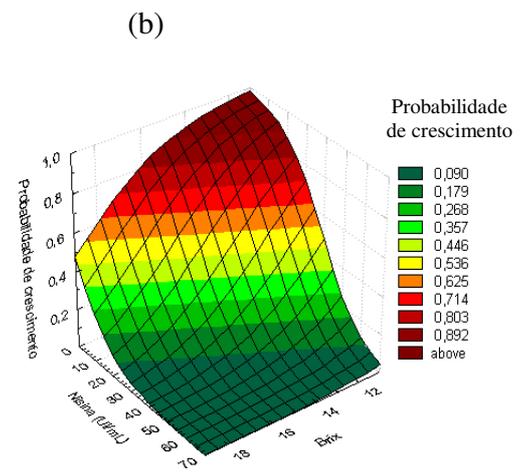
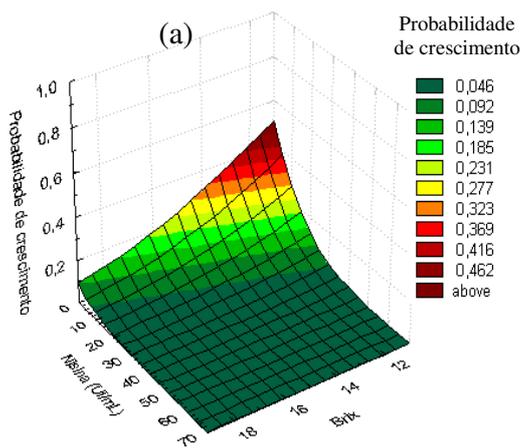
806

807

808

809

810



811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830 Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843 Tabela 1. Planejamento experimental central composto para crescimento de
 844 *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja.

Ensaio	Variáveis			
	T ^(a)	pH	Ni ^(b)	Brix ^(c)
1	28,5	3,7	17,5	13
2	45,5	3,7	17,5	13
3	28,5	5,1	17,5	13
4	45,5	5,1	17,5	13
5	28,5	3,7	52,5	13
6	45,5	3,7	52,5	13
7	28,5	5,1	52,5	13
8	45,5	5,1	52,5	13
9	28,5	3,7	17,5	17
10	45,5	3,7	17,5	17
11	28,5	5,1	17,5	17
12	45,5	5,1	17,5	17
13	28,5	3,7	52,5	17
14	45,5	3,7	52,5	17
15	28,5	5,1	52,5	17
16	45,5	5,1	52,5	17
17	20	4,4	35	15
18	54	4,4	35	15
19	37	3	35	15
20	37	5,8	35	15
21	37	4,4	0	15
22	37	4,4	70	15
23	37	4,4	35	11
24	37	4,4	35	19
25	37	4,4	35	15
26	37	4,4	35	15
27	37	4,4	35	15

845

^aT (temperatura °C); ^bNi (Nisina IU/ml); ^cBrix (concentração de sólidos solúveis)

846 Tabela 2. Características do suco concentrado de laranja.

Contagem total de mesófilos	1,5 UFC/ml
Bolores e leveduras	< 1 UFC/ml
pH	3,68
°Brix	66°
Contagem de esporos de <i>Alicyclobacillus</i>	< 1 esporo/ml

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865 Tabela 3. Respostas de crescimento e não crescimento de *A. acidoterrestris*
 866 CRA 7152 para as condições experimentais da Tabela 1.

Ensaio	Resposta		Ensaio	Resposta		Ensaio	Resposta	
	R1	R2		R1	R2		R1	R2
1	0	0	10	<u>1</u>	<u>1</u>	19	0	0
2	<u>1</u>	<u>1</u>	11	<u>1</u>	<u>1</u>	20	<u>1</u>	<u>1</u>
3	<u>1</u>	<u>1</u>	12	<u>1</u>	<u>1</u>	21	<u>1</u>	<u>1</u>
4	<u>1</u>	<u>1</u>	13	0	0	22	0	0
5	0	0	14	0	0	23	<u>1</u>	<u>1</u>
6	<u>1</u>	<u>1</u>	15	0	0	24	0	0
7	0	0	16	<u>1</u>	<u>1</u>	25	<u>1</u>	<u>1</u>
8	<u>1</u>	<u>1</u>	17	0	0	26	<u>1</u>	<u>1</u>
9	0	0	18	0	0	27	<u>1</u>	<u>1</u>

867 R1, R2 (repetições)

868

869

870

871

872

873

874

875

876

877

878

879

880

881

882

883 Tabela 4. Variáveis significativas para o modelo probabilístico.

Variável estimada	Coefficiente	Desvio padrão	<i>p</i> -valor
Constante	-14,4125	4,8079	0,0027
Temperatura	0,4202	0,1394	0,0026
pH	2,4888	0,8697	0,0042
Nisina	-0,1006	0,0351	0,0041
Brix*Temperatura	-0,0144	0,067	0,0309

884

885

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904 Tabela 5. Porcentagem de dados correto ajustado pelo modelo.

resposta observada	resposta predita		% correto
	não crescimento	crescimento	
não crescimento (0)	22	2	91,67
crescimento (1)	0	30	100
Global			96,3

905

906

907

908

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924 Tabela 6. Probabilidades de crescimento a $p=0,05$ de *A. acidoterrestris* CRA
 925 7152 em suco de laranja a pH 3,0 e diferentes valores de T, °Brix e
 926 concentração de Nisina.

11°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,1532	0,0620	0,0236	0,0088	0,0032	0,0012	0,0004	0,0002
24	0,3401	0,1586	0,0645	0,0246	0,0091	0,0034	0,0012	0,0005
28	0,5949	0,3494	0,1641	0,0670	0,0256	0,0095	0,0035	0,0013
32	0,8071	0,6048	0,3588	0,1699	0,0696	0,0266	0,0099	0,0036
36	0,9226	0,8135	0,6146	0,3684	0,1758	0,0723	0,0277	0,0103
40	0,9714	0,9255	0,8196	0,6243	0,3780	0,1818	0,0752	0,0289
44	0,9898	0,9725	0,9283	0,8256	0,6339	0,3877	0,1880	0,0781
48	0,9964	0,9902	0,9736	0,9310	0,8315	0,6434	0,3975	0,1944
15°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,0541	0,0205	0,0076	0,0028	0,0010	0,0004	0,0001	0,0000
24	0,1145	0,0452	0,0170	0,0063	0,0023	0,0008	0,0003	0,0001
28	0,2264	0,0967	0,0377	0,0141	0,0052	0,0019	0,0007	0,0003
32	0,3985	0,1950	0,0814	0,0314	0,0117	0,0043	0,0016	0,0006
36	0,5999	0,3541	0,1670	0,0683	0,0261	0,0097	0,0036	0,0013
40	0,7724	0,5538	0,3121	0,1423	0,0572	0,0217	0,0080	0,0030
44	0,8848	0,7374	0,5067	0,2730	0,1208	0,0478	0,0180	0,0067
48	0,9456	0,8641	0,6992	0,4595	0,2371	0,1021	0,0399	0,0150
17°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,0311	0,0116	0,0043	0,0016	0,0006	0,0002	0,0001	0,0000
24	0,0609	0,0231	0,0086	0,0032	0,0012	0,0004	0,0002	0,0001
28	0,1156	0,0456	0,0172	0,0064	0,0023	0,0009	0,0003	0,0001
32	0,2086	0,0879	0,0340	0,0127	0,0047	0,0017	0,0006	0,0002
36	0,3471	0,1628	0,0664	0,0253	0,0094	0,0035	0,0013	0,0005
40	0,5175	0,2817	0,1254	0,0498	0,0188	0,0070	0,0026	0,0009
44	0,6838	0,4416	0,2243	0,0957	0,0372	0,0139	0,0051	0,0019
48	0,8135	0,6147	0,3684	0,1758	0,0724	0,0277	0,0103	0,0038

927

928

929

930

931

932

933 Tabela 7. Probabilidades de crescimento a $p=0,05$ de *A. acidoterrestris* CRA
 934 7152 em suco de laranja a pH 3,5 e diferentes valores de T, °Brix e
 935 concentração de Nisina.

11°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,3856	0,1867	0,0774	0,0298	0,0111	0,0041	0,0015	0,0005
24	0,6414	0,3954	0,1930	0,0804	0,0310	0,0116	0,0043	0,0016
28	0,8360	0,6508	0,4053	0,1995	0,0835	0,0323	0,0120	0,0044
32	0,9356	0,8416	0,6601	0,4153	0,2062	0,0867	0,0336	0,0125
36	0,9764	0,9380	0,8470	0,6693	0,4253	0,2130	0,0901	0,0349
40	0,9916	0,9773	0,9404	0,8522	0,6784	0,4354	0,2200	0,0935
44	0,9970	0,9919	0,9782	0,9426	0,8574	0,6873	0,4456	0,2271
48	0,9990	0,9972	0,9923	0,9791	0,9448	0,8623	0,6961	0,4558
15°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,1655	0,0676	0,0258	0,0096	0,0035	0,0013	0,0005	0,0002
24	0,3098	0,1410	0,0566	0,0215	0,0080	0,0029	0,0011	0,0004
28	0,5040	0,2709	0,1196	0,0473	0,0178	0,0066	0,0024	0,0009
32	0,6969	0,4568	0,2352	0,1011	0,0395	0,0148	0,0055	0,0020
36	0,8388	0,6555	0,4104	0,2029	0,0851	0,0329	0,0123	0,0045
40	0,9217	0,8116	0,6117	0,3655	0,1740	0,0715	0,0274	0,0102
44	0,9638	0,9070	0,7809	0,5659	0,3228	0,1484	0,0599	0,0228
48	0,9837	0,9566	0,8897	0,7469	0,5190	0,2829	0,1261	0,0501
17°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,1003	0,0392	0,0147	0,0054	0,0020	0,0007	0,0003	0,0001
24	0,1836	0,0760	0,0292	0,0109	0,0040	0,0015	0,0005	0,0002
28	0,3121	0,1423	0,0572	0,0217	0,0080	0,0030	0,0011	0,0004
32	0,4778	0,2507	0,1090	0,0428	0,0161	0,0059	0,0022	0,0008
36	0,6486	0,4029	0,1979	0,0828	0,0319	0,0119	0,0044	0,0016
40	0,7882	0,5765	0,3323	0,1540	0,0624	0,0238	0,0088	0,0032
44	0,8825	0,7330	0,5010	0,2685	0,1184	0,0468	0,0176	0,0065
48	0,9381	0,8470	0,6694	0,4254	0,2131	0,0901	0,0349	0,0131

936

937

938

939

940

941

942 Tabela 8. Probabilidades de crescimento a $p=0,05$ de *A. acidoterrestris* CRA
 943 7152 em suco de laranja a pH 3,7 e diferentes valores de T, °Brix e
 944 concentração de Nisina.

11°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,5080	0,2741	0,1213	0,0481	0,0181	0,0067	0,0025	0,0009
24	0,7464	0,5183	0,2824	0,1258	0,0500	0,0189	0,0070	0,0026
28	0,8934	0,7541	0,5286	0,2908	0,1304	0,0520	0,0197	0,0073
32	0,9598	0,8973	0,7616	0,5388	0,2994	0,1351	0,0540	0,0205
36	0,9855	0,9614	0,9010	0,7690	0,5491	0,3081	0,1400	0,0562
40	0,9949	0,9861	0,9629	0,9047	0,7763	0,5592	0,3169	0,1451
44	0,9982	0,9951	0,9867	0,9643	0,9082	0,7833	0,5694	0,3259
48	0,9994	0,9983	0,9953	0,9872	0,9657	0,9115	0,7903	0,5794
15°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,2460	0,1066	0,0418	0,0157	0,0058	0,0021	0,0008	0,0003
24	0,4248	0,2126	0,0899	0,0349	0,0130	0,0048	0,0018	0,0006
28	0,6257	0,3793	0,1827	0,0756	0,0290	0,0108	0,0040	0,0015
32	0,7909	0,5804	0,3359	0,1561	0,0634	0,0241	0,0090	0,0033
36	0,8954	0,7579	0,5338	0,2951	0,1328	0,0530	0,0201	0,0074
40	0,9509	0,8763	0,7215	0,4865	0,2573	0,1125	0,0443	0,0167
44	0,9777	0,9413	0,8543	0,6820	0,4395	0,2228	0,0949	0,0369
48	0,9900	0,9732	0,9299	0,8292	0,6396	0,3936	0,1918	0,0799
17°Brix		Concentração de nisina (IU/mL)						
Temperatura °C	0	10	20	30	40	50	60	70
20	0,1550	0,0629	0,0239	0,0089	0,0033	0,0012	0,0004	0,0002
24	0,2701	0,1192	0,0471	0,0178	0,0066	0,0024	0,0009	0,0003
28	0,4273	0,2144	0,0907	0,0352	0,0132	0,0049	0,0018	0,0007
32	0,6008	0,3550	0,1675	0,0686	0,0262	0,0097	0,0036	0,0013
36	0,7522	0,5261	0,2887	0,1293	0,0515	0,0195	0,0072	0,0026
40	0,8596	0,6913	0,4502	0,2304	0,0987	0,0385	0,0144	0,0053
44	0,9251	0,8187	0,6228	0,3765	0,1809	0,0747	0,0287	0,0107
48	0,9614	0,9011	0,7691	0,5492	0,3082	0,1401	0,0562	0,0213

945

946

947

948

949

950

951 Tabela 9. pH crítico predito com $p=0,05$ do *A. acidoterrestris* CRAA 7152 em
 952 suco de laranja

11°Brix		Nisina (IU/mL)						
T (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70
20	-	2,9	3,3	3,7	4,1	4,5	4,9	5,3
25	-	-	-	3,2	3,6	4,0	4,4	4,8
30	-	-	-	-	3,1	3,5	3,9	4,3
35	-	-	-	-	-	2,9	3,4	3,8
40	-	-	-	-	-	-	-	3,2
45	-	-	-	-	-	-	-	-

15°Brix		Nisina (IU/mL)						
T (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70
20	3,0	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0	5,4	-
25	-	3,0	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0	5,4
30	-	-	3,0	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0
35	-	-	-	2,9	3,4	3,8	4,2	4,6
40	-	-	-	-	2,9	3,3	3,8	4,2
45	-	-	-	-	-	2,9	3,3	3,7

17°Brix		Nisina (IU/mL)						
T (°C)	0	10	20	30	40	50	60	70
20	3,2	3,6	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6	-
25	-	3,3	3,7	4,1	4,5	4,9	5,3	-
30	-	-	3,3	3,7	4,1	4,5	4,9	5,3
35	-	-	-	3,4	3,8	4,2	4,6	5,0
40	-	-	-	3,0	3,4	3,8	4,2	4,6
45	-	-	-	-	3,1	3,5	3,9	4,3

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962 Tabela 10. Temperatura critica predita com p=0,05 do *A. acidoterrestris* CRA

963 7152 em suco de Laranja

11°Brix				Nisina (IU/mL)				
pH	0	10	20	30	40	50	60	70
3	-	-	22,8	26,6	30,5	34,3	38,2	42,0
3,5	-	-	-	21,9	25,7	29,6	33,4	37,2
3,7	-	-	-	20,0	23,8	27,7	31,5	35,3
4	-	-	-	-	21,0	24,8	28,6	32,5
4,4	-	-	-	-	-	21,0	24,8	28,7
5,1	-	-	-	-	-	-	18,2	22,0

15°Brix				Nisina (IU/mL)				
pH	0	10	20	30	40	50	60	70
3	-	24,3	29,2	34,1	39,1	44,0	48,9	53,8
3,5	-	-	23,1	28,0	33,0	37,9	42,8	47,7
3,7	-	-	20,7	25,6	30,5	35,5	40,4	45,3
4	-	-	-	21,9	26,9	31,8	36,7	41,7
4,4	-	-	-	-	22,0	26,9	31,9	36,8
5,1	-	-	-	-	-	-	23,3	28,2

17°Brix				Nisina (IU/mL)				
pH	0	10	20	30	40	50	60	70
3	22,5	28,3	34,0	39,7	45,5	51,2	-	-
3,5	-	21,2	26,9	32,6	38,4	44,1	49,9	-
3,7	-	-	24,1	29,8	35,5	41,3	47,0	-
4	-	-	-	25,5	31,3	37,0	42,8	48,5
4,4	-	-	-	19,9	25,6	31,3	37,1	42,8
5,1	-	-	-	-	-	21,4	27,1	32,9

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974 Tabela 11. Concentração de nisina crítica para crescimento de *A.*
 975 *acidoterrestis* CRA 7152 a $p=0,05$ em suco de laranja.

11°Brix		Temperatura (°C)				
pH	20	25	30	35	40	45
3	12,2	25,2	38,2	51,2	64,2	-
3,5	24,6	37,6	50,6	63,6	-	-
3,7	29,5	42,5	55,5	68,5	-	-
4	36,9	49,9	63,0	-	-	-
4,4	46,8	59,8	-	-	-	-
15°Brix		Temperatura (°C)				
pH	20	25	30	35	40	45
3	0,8	10,9	21,0	31,2	41,3	51,5
3,5	13,1	23,3	33,4	43,6	53,7	63,9
3,7	18,1	28,2	38,4	48,5	58,7	68,8
4	25,5	35,6	45,8	55,9	66,1	-
4,4	35,4	45,5	55,7	65,8	-	-
17°Brix		Temperatura (°C)				
pH	20	25	30	35	40	45
3	-	-	3,9	11,2	18,4	25,7
3,5	1,7	9,0	16,2	23,5	30,8	38,1
3,7	6,6	13,9	21,2	28,5	35,8	43,0
4	14,0	21,3	28,6	35,9	43,2	50,5
4,4	23,9	31,2	38,5	45,8	53,1	60,4

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

Capítulo 3

**Modelagem do crescimento e tempo de
adaptação do *Alicyclobacillus acidoterrestris*
CRA 7152 em suco de laranja**

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“Journal of Food Protection”

1 **Microbiologia preditiva de *Alicyclobacillus***
2 **Modelagem do crescimento e tempo de adaptação do *Alicyclobacillus***
3 ***acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja**
4

5
6 Wilmer Edgard Luera Peña¹ and Pilar Rodriguez de Massaguer²
7

8
9 *Universidade Estadual de Campinas*
10 *Faculdade de Engenharia de Alimentos*
11 *Departamento de Ciências de Alimentos*
12 *CP 6121, CEP 13083-862*
13 *Campinas, SP - Brazil*
14

15
16
17 **Microbiologia preditiva de *Alicyclobacillus*:** suco de laranja,
18 *Alicyclobacillus*, modelagem
19

20 ²Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food
21 Engineering, Department of Food Science, Cidade Universitaria, CP 6121,
22 CEP: 13083-862. Fax: 19- Campinas, São Paulo, Brazil, E-mail address:

23 ¹edgardwil@hotmail.com, ²esteril@unicamp.br
24

25

RESUMO

26 O tempo de adaptação do *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco
27 de laranja foi estudado como resposta aos efeitos do pH (3 a 5,8),
28 temperatura (20 a 54°C), °Brix (11 a 19) e concentração de nisina (0 a 70
29 IU/ml). Usou-se um planejamento composto central rotatório para os ensaios
30 experimentais. A verificação dos microrganismos viáveis foi realizada via
31 plaqueamento em meio K (pH 3,7). Dois modelos primários foram usados
32 para representar o crescimento e o tempo de adaptação. O modelo
33 polinomial de segunda ordem foi aplicado para análise do efeito dos fatores.
34 Os resultados mostraram que o modelo de Baranyi & Roberts foi mais
35 adequado do que o modelo de Gompertz modificado em relação ao
36 coeficiente de determinação (R^2) na descrição dos dados experimentais. A
37 inibição da bactéria pode ser obtida sob várias das combinações estudadas,
38 por pelo menos 47 dias de estocagem. O menor tempo de adaptação foi
39 observado entre 37 e 45°C com pHs entre 4 e 5. Já os maiores tempos de
40 adaptação puderam ser obtidos próximos de 20°C com pH ao redor de 3,0.
41 A análise estatística do modelo quadrático mostrou que o tempo de
42 adaptação aumentou com a diminuição da temperatura, o aumento da
43 concentração de nisina e de sólidos solúveis e uma diminuição do pH. Os
44 parâmetros estatísticos que validaram o modelo foram de $R^2 = 0,816$, fator
45 bias 1,07 e fator de exatidão de 1,28. A manipulação de mais de um fator
46 (tecnologia de barreiras), bem como, o uso do antimicrobiano pode ser uma
47 alternativa na prevenção do desenvolvimento de *A. acidoterrestris* em suco de
48 laranja aumentando, portanto, a sua vida de prateleira.

49 O primeiro relatório de contaminação causada por microrganismo acidófilo e
50 formador de esporo ocorreu em suco de maçã envasado assepticamente na
51 Alemanha em 1982 (5). O microrganismo foi um aeróbio estrito resistente ao
52 calor, capaz de sobreviver a tratamentos térmicos normalmente aplicados a
53 processamento de sucos de frutas. A partir de então o conceito de
54 contaminação de sucos de frutas ácida foi sendo modificado, tendo como
55 alvo de destruição esta bactéria, na preservação do produto.

56 *Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria termoacidófila, não patogênica
57 e formadora de esporos que foi isolada e identificada de solo de floresta e de
58 vários sucos de frutas pasteurizados contaminados, tais como laranja, maçã
59 e maracujá (18, 22, 29, 33). *Alicyclobacillus* produz “off-flavour” em suco de
60 fruta; o metabolito contaminante foi identificado como medicinal (33). Os
61 compostos químicos responsáveis foram o guaiacol (29) e compostos
62 fenólicos (15). Este microrganismo cresce a temperaturas de 25 a 60°C (24)
63 com pHs variando entre 3,0 a 5,5 (23). Estudos para inativação térmica têm
64 sido conduzidos por vários autores (27, 11, 20, 18) mostrando que um
65 tratamento térmico convencional de pasteurização, aplicado a sucos de
66 frutas pode não ser suficiente para inativar os esporos de *Alicyclobacillus*.
67 Komitopoulou *et al.* (16) e Yamazaki *et al.* (34) estudaram o uso da nisina
68 (Concentração Mínima Inibitória) no controle da germinação de esporos de *A.*
69 *acidoterrestris*, indicando que o seu efeito inibidor foi dependente da
70 temperatura e do pH. Microbiologistas classificam a duração de fase lag (λ) e
71 a taxa específica de crescimento (μ_{max}) como os principais parâmetros que

72 caracterizam a curva de crescimento bacteriano (3). Muitos modelos têm sido
73 propostos para modelá-los. Porém, vários autores enfatizaram certas
74 dificuldades para estimar λ (1, 19). A razão é a falta de compreender
75 fisiologicamente o que acontece na “fase lag” e, são poucos os autores que
76 foram capazes de colocar estas informações no modelo para o cálculo deste
77 parâmetro (3). Os objetivos deste estudo foram: 1) Modelagem do
78 crescimento e/ou sobrevivência de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*
79 em suco de laranja usando os modelos de Baranyi & Roberts e, Gompertz
80 modificado e 2) Modelagem secundária do tempo de adaptação do
81 *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja como função do pH,
82 concentração de sólidos solúveis (°Brix), Temperatura de incubação e
83 concentração de nisina utilizando modelo polinomial de superfície de
84 resposta.

85

86

MATERIAL E MÉTODOS

87 **Cepa bacteriana e meios de cultura.** Foi usada uma cepa de
88 *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 gentilmente cedida pela Danisco
89 Cultor.

90 Meio de esporulação: *Alicyclobacillus acidocaldarius médium* (AAM) (20):
91 0,05 % de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 1,5 % de agar; 1,0g de Extrato de levedura; 0,2g de
92 $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,25g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,60g de KH_2PO_4 ;
93 1,0g de glicose e 1l de água. O pH foi ajustado para 4,0.

94 Meio de quantificação K: Peptona 5g; Glicose 1g; Extrato de levedura
95 2,5g; Tween-80 1g; Agar 15g; Água destilada 1,0l. O meio foi
96 esterilizado a 121°C por 15 minutos e o pH ajustado para 3,7 com ácido
97 málico 25% esterilizado por filtração (33).

98

99 **Preparação da suspensão de esporos.** Inicialmente foi realizado o
100 crescimento de células viáveis de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em 4 tubos
101 inclinados contendo meio PDA-Oxoid (Potato Dextrose Agar, pH = 5,6),
102 incubados a 44°C por 3 dias. Posteriormente o crescimento nos tubos foi
103 recolhido através de raspagem com baguetas estéreis de vidro utilizando 5
104 ml de água destilada estéril por tubo. A suspensão obtida foi transferida para
105 um tubo de rosca de 25x200 mm estéril e ativada a 80°C por 10 minutos,
106 seguido de resfriamento rápido em banho de gelo até temperatura ambiente.
107 Foi inoculado 0,1 ml da suspensão ativada em cada uma de 100 garrafas de
108 vidro de 290 ml contendo 60,0 ml de meio (AAM) solidificado e inclinado (35).
109 As 100 garrafas inoculadas foram incubadas por 9 dias a 45,0°C. Após
110 observação microscópica de 90% do campo esporulado via coloração de
111 esporos utilizando corante verde malaquita, foi realizada a coleta dos
112 esporos (20). Os esporos coletados foram lavados e re-suspendidos em
113 água destilada estéril após 3 centrifugações (12310g/15 min a 4°C), seguido
114 de lavagens alternadas, com adição de lisozima 0,3 mg/ml de suspensão
115 após a primeira lavagem e ajuste de pH até 11 para eliminação das células
116 vegetativas (31). A suspensão de esporos foi estocada a 4°C em água
117 destilada estéril até seu uso. A contagem foi realizada em meio K após

118 ativação térmica por 10 minutos a 80°C com plaqueamento em profundidade
119 e as placas invertidas incubadas a 43°C por 5 dias. A concentração da
120 suspensão de esporos foi de 8×10^8 esporos/ml.

121

122 **Planejamento experimental.** Foi estudado o efeito de quatro fatores
123 (pH, Temperatura, concentração de nisina e sólidos solúveis-Brix) no tempo
124 de adaptação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em
125 suco de laranja concentrado usando metodologia de superfície de resposta.
126 Implementou-se um planejamento fatorial fracionário composto de uma
127 combinação de 2^4 com 3 pontos centrais e 8 pontos axiais (4, 21). As faixas
128 dos fatores foram: pH (3 a 5,8), Temperatura (20 a 54)°C, °Brix (11 a 19) e
129 concentração de nisina (0 - 70IU/ml). O pH do suco de laranja foi ajustado
130 utilizando NaOH 5N e ácido málico 25% (p/v) medidos usando um
131 potenciômetro (DMPH-2 Digimed). Este ácido foi usado no ajuste do pH por
132 ser componente principal do suco de laranja (12). As diferentes
133 concentrações de sólidos solúveis-°Brix foram ajustadas com diferentes
134 diluições de água destilada estéril adicionadas no suco de laranja
135 concentrado e medido utilizando refratômetro ATAGO HSRO500. Todas as
136 amostras foram tratadas termicamente a 105°C por 10 min para eliminar
137 presença de possíveis competidores (17). A Nisina foi cedida pela Danisco
138 Cultor e utilizada após preparo de uma solução estoque contendo 10^4 IU/ml
139 em HCl 0,02N e esterilizada as 121°C por 15 minutos (26). A carga inicial de
140 *A. acidoterrestris* inoculada foi de $2,0 \times 10^2$ esporos/ml de suco de laranja,
141 ativados a 80°C por 10min. Para cada unidade experimental da Tabela 1

142 preparou-se 100ml de amostra de suco em frascos de vidro estéril, que foram
143 incubados até o crescimento mostrar fase estacionária verificada pela
144 estabilização da contagem das colônias em placas. Cada ensaio foi realizado
145 em duplicata e monitorado diariamente por plaqueamento em profundidade
146 em meio K (pH 3,7) seguido de incubação a 43°C por 5 dias.

147 Tabela 1

148

149 **Análise dos dados de crescimento.** Os dados de crescimento
150 experimental foram ajustados com as equações de Baranyi et al. (2) e de
151 Gompertz modificado usando o programa DMFIT de Baranyi. Assim foram
152 estimados os parâmetros cinéticos de crescimento da bactéria tempo de
153 adaptação “ λ ” (dias), velocidade máxima de crescimento “ μ ” (log(N/ml))/dia,
154 e população máxima (κ). λ leva em conta o tempo para o esporo germinar e
155 iniciar a reprodução celular evidenciado pelo aumento da contagem.

156

157 **Função de Baranyi & Roberts (2).** Esta função considera
158 características do substrato e do estágio de crescimento do microrganismo
159 inoculado em questão, critérios importantes para avaliar as influências dos
160 diferentes fatores que afetam o crescimento (pH, Nisina, Brix, temperatura),
161 provocando mudanças no meio e no metabolismo do microrganismo. Esta
162 função (equação 1) analisa o comportamento do microrganismo de maneira
163 mais abrangente que a equação de Gompertz.

164
$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A_n(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{\ell^{m\mu_{\max} A_n(t)} - 1}{\ell^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (1)$$

165 Onde a função A(t) significa uma regulação da resposta no tempo em relação
 166 às condições fisiológicas das células.

167
$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu_{\max} \cdot t} + e^{-h_0} - e^{-v_r - h_0})}{\mu_{\max}}$$

168 Onde: $h_0 = -\ln \alpha_0$, e o parâmetro α_0 é chamado de estado fisiológico da célula
 169 a $t=t_0$; $y(t)=\log_{10}$ da população microbiana; y_0 =população inicial a $t=0$;
 170 y_{\max} =população máxima; μ_{\max} = taxa de crescimento máxima; n = parâmetro
 171 relativo a curvatura depois da fase lag; m = parâmetro relativo a curvatura
 172 depois da fase exponencial.

173

174 **Função de Gompertz modificado (13).** Este modelo (equação 2) usa
 175 uma curva sigmóide para representar o crescimento com uma fase
 176 exponencial levemente curvilínea e um segmento inicial ascendente para a
 177 fase lag que não representa o caminho inicial do crescimento microbiano.

178
$$y(t) = a + c * \exp(-\exp(-b(t - M))) \quad (2)$$

179 Onde: $y(t)$ = Log da população no tempo t (UFC/ml); a = Log (N_0); c = Log(N-
 180 N_0) no final da fase Lag; b = inclinação correspondente a taxa de
 181 crescimento; M =tempo na qual a velocidade de crescimento absoluta é
 182 máxima, t = tempo.

183

184 **Modelo Polinomial de superfície de Resposta.** O modelo quadrático
185 foi usado para descrever a influência do pH, Brix, temperatura e
186 concentração de nisina no tempo de adaptação. Assim o seguinte modelo foi
187 implementado:

$$\begin{aligned} \lambda = & b_0 + b_1 T + b_2 T^2 + b_3 pH + b_4 pH^2 + b_5 Ni + b_6 Ni^2 + \\ 188 & b_7 Brix + b_8 Brix^2 + b_9 T * pH + b_{10} T * Ni + b_{11} T * Brix + \\ & b_{12} pH * Brix + b_{13} pH * Ni + b_{14} Brix * Ni + \varepsilon \end{aligned} \quad (3)$$

189 Onde: λ = tempo de adaptação (dias); T = temperatura de incubação (°C); Ni
190 = concentração de nisina (IU/ml); °Brix = concentração de sólidos solúveis;
191 $b_0 \dots b_{14}$ = coeficientes do modelo; ε = erro. Foi usado o procedimento de
192 desenho e análise de experimentos opção composto central do Software
193 Statistica 5.0. O modelo encontrado foi validado estatisticamente através de
194 análise de variância. O fator bias e exatidão também foram calculados como
195 descrito por Ross (25).

196

197 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

198 **Modelagem do crescimento via modelos primários.** Com o
199 programa DMFIT e utilizando como dados de entrada o log da população vs
200 tempo nos ensaios onde ocorreu crescimento, foram calculados os
201 parâmetros cinéticos das curvas de crescimento. A Figura 1 representa as
202 curvas de crescimento para os ensaios correspondentes aos pontos axiais e
203 ponto central do planejamento da Tabela 1.

204

Figura 1

205 Observa-se que os dados dos ensaios 20, 21, 23 e 25 foram ajustados pelos
206 modelos de Baranyi e Gompertz a diferença dos ensaios 18, 19, 22 e 24
207 cujas contagens não representaram curvas características de crescimento e
208 sim uma clara inibição da bactéria. Nestes 4 ensaios (18, 19, 22 e 24) não
209 houve duplicação de células, mas uma ligeira queda da carga inicialmente
210 inoculada onde cada fator no seu valor extremo foi determinante para inibir o
211 crescimento, considerando-se, portanto um tempo de adaptação de pelo
212 menos 47 dias nas condições testadas para os ensaios 19, 22 e 24; porém
213 para o ensaio 18 este tempo de adaptação foi de 27 dias, comparação
214 importante pode ser feita entre este ensaio e o ensaio 23, pois o aumento da
215 temperatura de 37 para 54° e de sólidos solúveis de 11 para 15°Brix
216 provocaram, depois de 27 dias, redução do nível da população microbiana
217 (ensaio 18) contrariamente ao que aconteceu com o ensaio 23 onde houve
218 aumento dessa população. No caso do ensaio 21 o tempo de adaptação foi
219 muito curto. Walls e Chuyate (33) observaram rápidos crescimentos em pHs
220 de 4,5 e 5,0 do que em 3,5 a 35°C. Por outro lado Pinhatti et al. (23)
221 mostraram pH ótimo de crescimento desta bactéria entre 3,5 a 5,0. Esta faixa
222 ótima é dependente da cepa e do meio em que ela se desenvolve. O tempo
223 de adaptação para os experimentos 23 e 20 ficaram em 27,4 e 16 dias,
224 respectivamente, e para o ensaio 25 em 16,2 dias. Esses valores de tempo
225 de adaptação foram calculados pelo modelo de Baranyi & Roberts que
226 ajustou melhor os dados experimentais em relação ao modelo de Gompertz

227 (Tabela 2). Observou-se também uma diferença na população final detectada
228 para vários ensaios, produto do efeito dos fatores estudados.

229 Tabela 2

230 A Figura 2 apresenta o efeito de pH e concentração de nisina nas curvas de
231 crescimento para os ensaios realizados a 45,5°C e 13°Brix.

232 Figura 2

233 Sendo 45°C a temperatura ótima para o crescimento da respectiva bactéria
234 (6) observou-se a influência do pH e da concentração de Nisina. Nos 4
235 ensaios (2, 4, 6, 8), da Figura 2, houve crescimento. Observou-se maior
236 tempo de adaptação (31 dias para o ensaio 6) combinação de menor pH
237 (3,7), e maior concentração de nisina (52,5IU/ml); já o menor tempo de
238 adaptação (11 dias-ensaio 4) registrou-se para um pH de 5,1 (maior valor) e
239 17,5 IU/ml (menor valor), condição perigosa pois desta forma a deterioração
240 acontecerá. Delves-Broughton (9) mostrou queda pronunciada da atividade
241 da nisina durante a estocagem a altos valores de pH e temperatura. A
242 população final máxima também foi influenciada sendo maior a pH 5,1 do
243 que a pH 3,7. Usando esses modelos de crescimento é possível estimar o
244 tempo mínimo para a população microbiana atingir 10⁴UFC/ml, nível na qual a
245 presença de guaiacol pode ser detectada sensorialmente (22). Assim, para
246 os ensaios (45,5°C, pH 5,1, 17,5IU/ml e 13°Brix); 4 5,5°C, pH 5,1, 52,5IU/ml e
247 13°Brix); (37°C, pH 5,8, 35IU/ml e 15°Brix) e (37°C , pH 4,4, 0IU/ml e 15°Bri),
248 16,5; 23; 30 e 1 dias seriam suficientes para atingir esse nível de população
249 bacteriana.

250 No caso das amostras com 17°Brix incubadas a 45,5°C, embora com
251 crescimento no final dos 47 dias de incubação, o tempo de adaptação foi
252 bem maior do que as de 13 °Brix, evidenciando o efeito da atividade de água
253 reduzida (Figura 3).

254 Figura 3

255 No caso das curvas da Figura 3, o modelo de Baranyi & Roberts mostrou-se
256 também mais adequado (R^2 entre 0,94 a 0,96) para descrever os dados
257 experimentais em relação ao modelo de Gompertz (R^2 entre 0,79 a 0,94)
258 como observado pelos dados das contagens e os ajustados pelos modelos
259 em anexo. Baty e Delignette-Muller (3) mostraram que o modelo de Baranyi
260 (2) apresentou melhor ajuste que os modelos de Gompertz e exponencial do
261 lag. Entretanto Graham *et al.* (14) mostraram que ambos os modelos
262 (Gompertz e Baranyi) tiveram bons ajustes para descrever curvas de
263 crescimento microbiano.

264 Pela figura 3 observou-se que apenas o ensaio 14 detectou aumento da
265 carga microbiana inicialmente inoculada, conseguindo-se desta maneira,
266 mesmo em condições ótimas de temperatura de crescimento, obstruir o seu
267 desenvolvimento pós-germinativo e posterior duplicação; mas com tendência
268 a diminuição ao final dos 47 dias de incubação. Komitopoulou *et al.* (16)
269 mostraram que com 50IU de nisina /ml em suco de laranja simples ocorreu
270 pouco crescimento, com aproximadamente o dobro da carga inoculada
271 inicialmente (4×10^2 UFC/ml) e 5 dias de incubação a 44°C. Porém, nesta
272 pesquisa, conseguiu-se inibí-los com 52,5IU/ml de suco, pH 3,7 e 17°Brix por

273 até 47 dias incubados a 45,5°C. Resultado relevante para casos de
274 transporte de suco de laranja em condições de temperatura de abuso de até
275 45,5°C. A comparação entre as Figuras 2 e 3 indica que a 17°Brix não houve
276 grande aumento da população final em contraste com o ocorrido em dois
277 ensaios com 13°Brix (ensaios 4 e 8), indicando influência dos fatores
278 estudados. Nesses ensaios observou-se que podem ser obtidos tempos de
279 adaptação maiores do que os verificados a 13°Brix. Sinigaglia et al. (28)
280 mostraram maior viabilidade a altos valores de atividade de água. No ensaio
281 12 obteve-se 25,2 dias de adaptação, já para os ensaios 10 e 16 o tempo de
282 adaptação foi de até um mês.

283 Nas amostras incubadas a 28,5°C, houve apenas crescimento para os
284 ensaios 3 (pH 5,1 Nisina 17,5 IU/ml e 13°Brix) e 11 (pH 5,1 Nisina 17,5 IU/ml
285 e 17°Brix) (Figura 4). Os tempos de adaptação observados foram longos, de
286 até 36 dias para o ensaio 11 e de 29 dias no caso do ensaio 3. Nos outros
287 experimentos realizados na mesma temperatura, não houve aumento da
288 população inicialmente inoculada, apresentando ainda diminuição (ensaio 5);
289 assim considerou-se 47 dias de tempo de adaptação para os ensaios 1, 7, 9,
290 13 e 15, e de 25 dias para o ensaio 5 dado que, a partir deste tempo, houve
291 uma franca redução da população nesta condição. Vários autores (10, 22,
292 32) indicaram temperaturas mínimas de crescimento entre 20 a 25°C. Porém
293 diferentes combinações de pH, concentração de nisina relativamente baixa e
294 °Brix resultaram ser inibitórias a 28,5°C até 47 dias de incubação.

295

Figura 4

296 Em todas as curvas de crescimento, observou-se um certo período de
297 latência antes do aumento e/ou redução da população microbiana, indicando
298 que houve diminuição da atividade da bacteriocina durante a estocagem.
299 Este fato foi mais pronunciado a altos valores de pHs e temperatura,
300 mostrando atividade bacteriostática deste conservante, confirmada também
301 por Komitopoulou *et al.* (16) e Yamazaki *et al.* (34).

302

303 **Modelagem do tempo de adaptação via modelo quadrático.** Os
304 dados de tempo de adaptação (Tabela 3) observados e obtidos pelo ajuste
305 dos dados de crescimento aos modelos primários foram utilizados para
306 modelagem de superfície de resposta.

307

Tabela 3

308 Os dados de tempo de adaptação (dias) como função dos efeitos principais
309 do pH, °Brix, concentração de nisina e temperatura, e suas interações, foram
310 ajustados mediante regressão ao modelo da equação 3.

311 A Tabela 4 apresenta os ajustes dos coeficientes com nível de probabilidade
312 de 0,05.

313

Tabela 4

314 Observa-se que todas as variáveis estudadas foram significativas ($p < 0,05$),
315 tanto no nível linear como no quadrático, assim como algumas das
316 interações: Temperatura*pH, Temperatura*nisina, Temperatura*Brix, pH*Ni e
317 nisina*Brix.

318 Realizou-se a análise dos efeitos para cada fator individual e suas
319 interações, mostradas na Figura 5, mediante o Software Statistica 5.0.
320 Observando-se que dois fatores, temperatura e pH tiveram efeitos negativos
321 (o aumento da temperatura ou do pH causou uma diminuição do tempo de
322 adaptação), entretanto o efeito da concentração de nisina e concentração de
323 sólidos solúveis foram positivos (o aumento do nível desses fatores provocou
324 um aumento do tempo de adaptação). Entre as interações, relevantes
325 observamos que o efeito Temperatura*pH foi negativo, porém as interações
326 T*Brix, T*nisina, Ni*Brix e pH*Nisina foram favoráveis para o aumento da
327 vida de prateleira do suco, mesmo que o aumento da temperatura e pH
328 isoladamente provocassem queda nesse tempo de adaptação. Assim,
329 combinações de T*nisina, T*Brix, pH*nisina e Nisina*Brix foram favoráveis
330 para o aumento da vida de prateleira do suco.

331

Figura 5

332 O gráfico de Pareto, da Figura 6, apresenta os efeitos padronizados dos
333 diferentes parâmetros do modelo encontrado. Este efeito padronizado foi
334 definido como o coeficiente estimado dividido pelo erro standardizado
335 (*bi/sei*). Qualquer efeito que excedeu a linha vertical ($p=0,05$) foi considerado
336 significativo. Assim, os seguintes fatores em ordem decrescente de
337 importância tiveram efeito significativo: T, pH, Brix², nisina, T², Brix, pH²,
338 T*pH, nisina², pH*nisina, T*Brix, Nisina*Brix, T*Nisina e pH*Brix.

339

Figura 6

340 A equação 4 mostra o modelo quadrático encontrado

$$\lambda = 15,70 - 6,34542T + 5,53635T^2 - 5,30458pH + 4,04885pH^2 + 5,26292Ni + 2,28635Ni^2 + 5,13792Brix + 5,58635Brix^2 - 3,06813T * pH + 1,24213T * Ni + 1,60562T * Brix + 2,19438pH * Ni + 1,51813Ni * Brix \quad (4)$$

342 A Tabela 5 apresenta a Análise de Variância (Anova) que valida
 343 estatisticamente o modelo quadrático. O teste F aplicado resultou em
 344 $F_{calculado} > F_{tabelado}$, com $R^2 = 0,816$. Graham *et al.* (14) também usaram
 345 modelo quadrático para estudar o efeito da temperatura, pH e cloreto de
 346 sódio no tempo de lag de *Clostridium botulinum* não proteolítico obtendo $R^2 =$
 347 0,856. Os fatores bias e exatidão ficaram em 1,07 e 1,28, respectivamente,
 348 mostrando um certo grau de desvio entre a predição realizada pelo modelo e
 349 os valores experimentais em até 28%, em média (fator exatidão). Delignette-
 350 Muller *et al.* (8), estudando 755 casos de predição da literatura, onde 468
 351 usaram modelo polinomial e 287 modelos de raiz quadrada, mostraram que
 352 os erros médios foram altos para modelos polinomiais quando usados para
 353 modelar o tempo de geração e tempo de adaptação, resultando em média
 354 em torno de 25%, e leve tendência para o lado não seguro. A Figura 7
 355 apresenta uma comparação gráfica entre os valores preditos contra os
 356 valores observados e distribuição dos erros relativos. Observa-se que o
 357 modelo não ajustou bem os ensaios com tempo de adaptação de 47 dias.
 358 Este tempo de adaptação representou apenas o final do experimento sem
 359 indicar se houve aumento ou diminuição da população microbiana; fato que
 360 pode estar provocando desvios na relação variável dependente e
 361 independente provocando falta de ajuste do modelo para essas condições.
 362 Embora o fator bias mostrou uma leve tendência, em média de até 7% na

363 predição do lado não seguro, a análise dos resíduos (Figura 7) apresentou
364 aleatoriedade nas predições sem tendência sistemática das mesmas
365 validando, portanto, o modelo polinomial.

366 Tabela 5

367 Figura 7

368 As Figuras 8 e 9 apresentam as superfícies de resposta para o tempo de
369 adaptação. Como esperado, a temperatura foi o fator com maior impacto.
370 Observa-se pela Figura 8a que o maior tempo de adaptação foi encontrado
371 para elevadas concentrações de sólidos solúveis e altas temperaturas. Fato
372 discutido por Splittsoesser et al. (30) que mostraram inibição do crescimento
373 de *Alicyclobacillus* quando o Brix superou 18,5°. Observou-se também
374 temperaturas ótimas de crescimento em torno de 37 a 45°C (menor tempo de
375 adaptação) indicando características mesofílicas desta cepa. Cerny et al. (6)
376 encontraram comportamentos similares para a cepa DSM 2498 em suco de
377 laranja com bons crescimentos a 30, 35 e 45°C. O efeito da temperatura foi
378 totalmente quadrático. Na Figura 8b a influência da concentração de nisina é
379 evidenciada em relação ao pH. Delves-Broughton (9) indicou que em pH de 3
380 a 4 a nisina teve maior atividade antimicrobiana, conseqüentemente maiores
381 tempos de adaptação podem ser conseguidos nessas faixas.

382 Figura 8

383 Na Figura 9a, o tempo de adaptação aumentou à medida que se afastou dos
384 valores de temperatura entre 37 a 45°C para uma concentração fixa de

385 nisina; no entanto, aumentando esta concentração é possível obter maiores
386 tempos de adaptação. Na Figura 9b, a interação entre a temperatura e o pH
387 para sucos com 15°Brix e 35 IU/ml de nisina foi observada com menores
388 tempos de adaptação para regiões de temperatura entre 37 e 45°C e pHs
389 entre 4 e 5, informação importante para condições de abuso de temperatura.
390 Já maiores tempos de adaptação podem ser obtidos com temperatura de
391 incubação a 20°C e pH em torno de 3 que são condições mais adversas para
392 o microrganismo e favoráveis para a atividade da bacteriocina (7).

393 Figura 9

394 Concluiu-se que o uso da nisina é uma opção para o controle do crescimento
395 do *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja. O uso do modelo
396 primário de Baranyi & Robertz ajustou melhor os dados de crescimento do
397 que o modelo de Gompertz. Usando esses modelos foi estimado o tempo
398 mínimo para a população microbiana atingir 10⁴UFC/ml, nível na qual a
399 presença de guaiacol pode ser detectada sensorialmente. Assim, para os
400 ensaios (45,5°C, pH 5,1, 17,5IU/ml e 13°Brix); (45, 5°C, pH 5,1, 52,5IU/ml e
401 13°Brix); (37°C, pH 5,8, 35IU/ml e 15°Brix) e (37°C , pH 4,4, 0IU/ml e 15°Bri)
402 16,5; 23; 30 e 1 dias seriam suficientes para atingir esse nível de população
403 bacteriana. Ocorrendo a deterioração do produto.

404 O tempo de adaptação foi afetado principalmente pela temperatura (20 a
405 54°C) seguido pelo pH (3 a 5,8), Nisina (0 a 70 IU/ml) e concentração de
406 sólidos solúveis (11 a 19°Brix). As seguintes interações foram significativas
407 pH*Nisina, temperatura*Brix, nisina*Brix, temperatura *nisina e pH*Brix e o

408 nível linear e quadrático das quatro variáveis. Tempos de adaptação de pelo
409 menos 47 dias foram encontrados experimentalmente para várias
410 combinações dos fatores (28,5°C, pH 3,7, 17,5 IU/ml e 17°Brix); (45,5°C, pH
411 3,7, 52,5 IU/ml) e (17°Brix e, 28,5°C, pH 5,1, 52,5 IU/ml e 17°Brix). Por outro
412 lado, usando o modelo implementado, podem ser preditas situações novas
413 não usadas no planejamento experimental. Assim, para sucos com 12°Brix,
414 pH 4,0, seria necessário 54IU de nisina/ml para se manter estáveis
415 microbiologicamente por até 47, 38 e 32 dias quando incubadas a
416 temperaturas de 25, 30 e 35°C respectivamente. A manipulação de mais de
417 um fator (Tecnologia de obstáculos), bem como o uso de antimicrobiano
418 pode ser uma alternativa para evitar o desenvolvimento do *Alicyclobacillus*
419 *acidoterrestris* em suco de laranja e conseqüentemente aumentar a vida de
420 prateleira do produto.

421

422

AGRADECIMENTOS

423 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp pelo
424 apoio financeiro. A Danisco Cultor do Brasil pelo fornecimento da nisina.

425

426

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 427 1. Baranyi, J. 2002. Stochastic modeling of bacterial lag phase. *Int J. Food*
428 *Microbiol.* 73: 203-206.
- 429 2. Baranyi, J. and Roberts, A.T. 1995. Mathematics of predictive food
430 microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 199-218.

- 431 3. Baty, F. and Delignette-Muller, M.L. 2004. Estimating the bacterial lag
432 time: which model, which precision?. *Int. J. Food Microbiol* 91: 261-277.
- 433 4. Bruns, R.E., Barros Neto, B. and Scarminio, J.S. 1995. Planejamento e
434 otimização de experimentos, 2ª Edição, Editora da Unicamp Campinas,
435 pp.299.
- 436 5. Cerny, G., Hennlich, W. and Poralla, K. 1984. Spoilage of fruit juice by
437 bacilli: Isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Z.*
438 *Lebensmitte. Unters. Forsch.* 179: 224-227.
- 439 6. Cerny, Y.G., Duong, H.A., Hennlich, W. and Miller, S. 2000.
440 *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in
441 fruit juices. *Food Aus.*, 52(7): 289-291.
- 442 7. Davies, E.A., Bevis, H.E., Potter, R., Harris, J., Williams, G.C., Delves-
443 Broughton. 1998. J. The effect of pH on the stability of nisin solution
444 during autoclaving. *Letters. Appl. Microbiol*, 27, 186-187.
- 445 8. Delignette-Muller, M.L.; Rosso, L.; Flandrois, J.P. 1995. Accuracy of
446 microbial growth predictions with square root and polynomial models.
447 *International J. Food Microbiol.* 27, 139-146.
- 448 9. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative.
449 *Food Technol.* 44(11): 100-117.
- 450 10. Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., Pinhatti, E.A. and Variane, S.F. 2001.
451 Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices:
452 Detection Methods, Ecology, and Involvement in the Deterioration of Fruit
453 Juices- Report of the research project-part III. *Fruit Processing.* 3: 95-101.

- 454 11. Eiroa, V.N.M., Junqueira, A.C.V. and Schmidt, L.F. 1999. *Alicyclobacillus*
455 in orange juice: occurrence and heat resistance of spore. *J. Food Protect.*
456 62(8): 883-886.
- 457 12. Farnworth, E.R., Lagacc, M., Couture, R., Yaylayan, V., Stewart, B. 2001.
458 Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical
459 properties of orange juice. *Food Res. Int.* 34: 25-30.
- 460 13. Gibson, A.M, Bratchell, N. and Roberts, T. 1987. The effect of sodium
461 chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium*
462 *botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. App. Bacteriol.* 62: 479-90.
- 463 14. Graham, A.; Mason, D.R.; Peck, M.W. 1996. Predictive model of the effect
464 of temperature, pH and sodium chloride on growth from spores of non-
465 proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 69-85.
- 466 15. Jensen, N., Whitfield, F.B., 2003. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in
467 the development of a disinfectant taint shelf-stable fruit juice. *Lett. App.*
468 *Microbiol.* 36, 9-14
- 469 16. Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J. and
470 Adams, M.R. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its
471 control by nisin. *J. Food Sci. and Technol.* 34: 81-85.
- 472 17. Massaguer, P.R., Pacheco, P.C., Atarassi, M.M., Peña, W.L., Gonçalves,
473 A.C., Paula, N.A., Geraldini, L.H., Liossi, L.L., Gagliazzi, M.R., Guerra,
474 V.A. 2002. Sensibility and Specificity of Methods for *Alicyclobacillus*
475 Detection and Quantification: A collaborative study. *Fruit Processing*, 11,
476 478-482.

- 477 18. Mc KNIGHT, I.C.S. (2003). Isolamento e identificação de *Alicyclobacillus*
478 *acidoterrestris* a partir de sucos de maracujá e abacaxi pasteurizados, e
479 determinação da resistência térmica de seus esporos (Tese de
480 Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
- 481 19. McKellar, R.C. 1997. A heterogeneous population model for the analysis
482 of bacterial growth kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 179-186.
- 483 20. Murakami, M., Tedzuka, H., Yamazaki, K. 1998. Thermal resistance of
484 *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH, *Food*
485 *Microbiol.* 15: 577-582.
- 486 21. Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., 2002. Como fazer experimentos
487 segunda edição, Editora Unicamp, pp.401.
- 488 22. Pettipher, G.L., Osmundson, M.E. and Murphy, J.M. 1997. Methods for
489 the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and
490 investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-
491 containing drinks. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 185-189.
- 492 23. Pinhatti, M.E.M.C., Variani, S., Eguchi, S.Y. and Manfio, G.P. 1997.
493 Detection of *Acidothermophilic bacilli* in industrialized fruit juices. *Fruit*
494 *processing.* 9: 350-353.
- 495 24. Previdi, P.M., Colla, F. and Vicini, E. 1995. Characterization of
496 *alicyclobacillus* a sporeforming thermophilic acidophilic bacterium. *Ind.*
497 *Conserve.* pp.128-132.
- 498 25. Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in
499 food microbiology. *J. App. Bacteriol.* 81, 501-508

- 500 26. Scott, V.N. and Taylor, S.L. 1981. Temperature, pH and spore load
501 effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *C. botulinum*
502 spores. *J. Food Sci.* 46: 121-125.
- 503 27. Silva, F.M., Gibbs, P., Margarida, C.V. and Silva, C.L.M. 1999. Thermal
504 inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different
505 temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit
506 processes. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 95-103.
- 507 28. Sinigaglia, M.; Corbo, M.R.; Altieri, C.; Campaniello, D.; D'amato, D.;
508 Bevilacqua, A. 2003. Combined effects of temperature, water activity, and
509 pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *J. Food Protect.* 66, 12,
510 2216-2221.
- 511 29. Splittstoesser, C., Lee, Y. and Churey, J.J. 1998. Control of
512 *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, Food and Environ. Sanit.* 18(9):
513 585-587.
- 514 30. Splittstoesser, D.F., Churey, J.J. and Lee, Y. 1994. Growth characteristics
515 of *aciduric sporeforming Bacilli* isolated from fruit juices. *J. Food Protect.*
516 57: 1080-1083.
- 517 31. Stumbo, C.R. 1973. Thermobacteriology in food processing, Academic
518 Press, London.
- 519 32. Walls, I and Chuyate, R. 2000. Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus*
520 *acidoterrestris*. *Food Aus.* 52(7): 286-288.
- 521 33. Walls, I. and Chuyate, R. 1998. *Alicyclobacillus*-historical perspective and
522 preliminary characterization study, *Dairy food and Environ. Sanit.* 8: 495-
523 503.

- 524 34. Yamazaki, K., Murakami, M., Kawi, Y., Inoue, N. and Matsuda, T. 2000.
525 Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks,
526 *F. Microbiol.* 17: 315–320.
- 527 35. Yamazaki, K., Teduka, H. and Shinano, H. 1996. Isolation and
528 identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages.
529 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 543-545.
- 530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546

547

548

549

550

551

552 *FIGURA 1. Curvas e dados de Crescimento de A. acidoterrestis CRA 7152*
553 *para os ensaios correspondentes aos pontos axiais e ponto central: (*)*
554 *numero de ensaio; (21) pH, 4,4, 37°C, concentração de nisina, 0IU/ml,*
555 *15°Brix; (20) pH, 5,8, 37°C, concentração de nisina , 35IU/ml, 15°Brix; (25)*
556 *pH, 4,4, 37°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 15° Brix; (23) pH, 4,4, 37°C,*
557 *concentração de nisina, 35IU/ml, 19°Brix; (22) pH, 4,4, 37°C, concentração*
558 *de nisina, 70IU/ml, 15°Brix; (24) pH, 4,4, 37°C, co ncentração de nisina,*
559 *35IU/ml, 19°Brix; (19) pH, 3, 37°C, concentração de nisina, 35IU/ml, 15°Brix;*
560 *(18) pH, 4,4, 54°C, concentração de nisina, 35IU/ml , 15°Brix.*

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577 *FIGURA 2. Curvas de crescimento de A. acidoterrestris CRA 7152 em suco*
578 *de laranja concentrado: 13°Brix e 45,5°C; (*) numero de ensaio; (4) pH=5,1,*
579 *concentração de nisina 17,5 IU/ml, (8) pH=5,1, concentração de nisina 52,5*
580 *IU/ml, (2) pH=3,7, concentração de nisina 17,5 IU/ml e (6) pH=3,7*
581 *concentração de nisina 52,5IU/ml.*

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601 *FIGURA 3. Curvas de crescimento de A. acidoterrestris CRA 7152 em suco*
602 *de laranja concentrado: 17ºBrix e 45,5ºC: (*) número de ensaio; (10) pH, 3,7*
603 *concentração de nisina 17,1IU/ml; (12) pH, 5,1 concentração de nisina*
604 *17,1IU/ml; (16) pH, 5,1 concentração de nisina 52,5IU/ml; (14) pH, 3,7*
605 *concentração de nisina 52,5IU/ml*

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620 FIGURA 4. *Curvas e dados de crescimento de A. acidoterrestris CRA 7152 a*
621 *diferentes valores de pH, Brix e concentração de nisina incubados a 28,5°C:*
622 *(◆) pH, 5,1, concentração de nisina 17,5, 13Brix; (■) pH, 5,1, concentração*
623 *de nisina 17,5, 17Brix; (×) pH, 3,7, concentração de nisina 17,5, 13Brix; ()*
624 *pH, 3,7, concentração de nisina 52,5, 13Brix; (*) pH, 5,1, concentração de*
625 *nisina 52,5, 13Brix; (O) pH, 3,7, concentração de nisina 17,5, 17Brix; (◇)*
626 *pH, 3,7, concentração de nisina 52,5, 17Brix; (Δ) pH, 5,1, concentração de*
627 *nisina 52,5, 17Brix.*

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646 FIGURA 5. *Histograma de efeitos significativos no tempo de adaptação de A.*
647 *acidoterrestres CRA 7152 em suco de laranja concentrado.*

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666 *FIGURA 6. Gráfico de Pareto para avaliar o efeito dos parâmetros no tempo*
667 *de adaptação do A. acidoterrestris CRA 7152 em suco de laranja*
668 *concentrado.*

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686 FIGURA 7. *Valores observados vs valores preditos de tempo de adaptação*
687 *de A. acidoterrestris e resíduos relativos.*

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706 FIGURA 8. *Superfície de resposta para o tempo de adaptação: (a) °Brix vs*
707 *Temperatura, pH 4,4, e concentração de Nisina 35IU/ml; (b) concentração de*
708 *Nisina vs pH, 15°Brix e 37°C.*

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726 FIGURA 9. *Superfície de resposta para o tempo de adaptação: (a)*
727 *Temperatura vs concentração de Nisina, pH 4,4, e 15 °Brix; (b) Temperatura vs*
728 *pH, 15°Brix e 35 IU/ml de nisina.*

729

730

731

732

733

734

735

736

737 TABELA 1. *Planejamento fatorial fracionário para*
 738 *crescimento de A. acidoterrestris CRA 7152 em suco*
 739 *concentrado de laranja.*

Ensaio	Variáveis			
	T ^(a)	pH	Ni ^(b)	°Brix ^(c)
1	28.5	3.7	17.5	13
2	45.5	3.7	17.5	13
3	28.5	5.1	17.5	13
4	45.5	5.1	17.5	13
5	28.5	3.7	52.5	13
6	45.5	3.7	52.5	13
7	28.5	5.1	52.5	13
8	45.5	5.1	52.5	13
9	28.5	3.7	17.5	17
10	45.5	3.7	17.5	17
11	28.5	5.1	17.5	17
12	45.5	5.1	17.5	17
13	28.5	3.7	52.5	17
14	45.5	3.7	52.5	17
15	28.5	5.1	52.5	17
16	45.5	5.1	52.5	17
17	20	4.4	35	15
18	54	4.4	35	15
19	37	3	35	15
20	37	5.8	35	15
21	37	4.4	0	15
22	37	4.4	70	15
23	37	4.4	35	11
24	37	4.4	35	19
25	37	4.4	35	15
26	37	4.4	35	15
27	37	4.4	35	15

740 ^aT (temperatura °C); ^bNi (Nisina IU/ml); ^c°Brix (concentração de sólidos solúveis)

741 TABELA 2. *Parâmetros de crescimento do A. acidoterrestris CRA 7152 em*
 742 *suco concentrado de laranja calculados pelos modelos de Baranyi & Roberts*
 743 *e Gompertz.*

Ensaio ^(a)	Modelo	Tempo de adaptação (dias)	Taxa de crescimento (log((ufc/ml)/dia))	População máxima Log(UFC/ml)	^(b) R ²
2	Observado	24			
	Gompertz	23,3	0,0735	2,73	0,92
	Baranyi	23,7	0,1038	2,73	0,92
4	Observado	9			
	Gompertz	12,4	0,452	5,99	0,98
	Baranyi	11,3	0,345	5,94	0,99
6	Observado	31			
	Gompertz	21,1	0,038	2,65	0,63
	Baranyi	17,4	0,037	2,78	0,77
8	Observado	17			
	Gompertz	14	0,229	6,13	0,98
	Baranyi	12,8	0,191	5,97	0,98
20	Observado	18			
	Gompertz	16,4	0,151	5,01	0,95
	Baranyi	15,1	0,126	4,84	0,96
21	Observado	1			
	Gompertz	-	0,22	7,00	-
	Baranyi	<1	1,00	6,99	0,97
23	Observado	27			
	Gompertz	25,4	0,158	3,40	0,98
	Baranyi	27,4	0,180	3,40	0,98
25	Observado	16			
	Gompertz	14,5	0,07	3,56	0,95
	Baranyi	16,2	0,16	3,58	0,96
10	Observado	28			
	Gompertz	26,4	0,03	3,71	0,79
	Baranyi	32,7	0,09	2,97	0,94
12	Observado	26			
	Gompertz	21,1	0,04	2,95	0,90
	Baranyi	25,2	0,07	2,94	0,96
16	Observado	36			
	Gompertz	26,1	0,035	2,95	0,94
	Baranyi	29,0	0,053	2,84	0,96

744 ^aonde foi evidenciado crescimento; ^bcoeficiente de correlação.

745 TABELA 3. *Tempo de adaptação de A. acidoterrestis CRA 7152*
 746 *experimentais utilizados para o ajuste do modelo quadrático.*

Ensaio	Tempo de adaptação (dias)	Ensaio	Tempo de adaptação (dias)	Ensaio	Tempo de adaptação (dias)
1	47	10	32,7	19	47
2	23,7	11	36	20	15,1
3	29	12	25,2	21	1
4	9	13	47	22	47
5	25	14	47	23	27,4
6	31	15	47	24	47
7	47	16	29	25	16,2
8	12,8	17	47	26	16,2
9	47	18	27	27	14,7

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

TABELA 4. *Coefficientes de regressão*

760

significativos do modelo polinomial para o

761

tempo de adaptação de A. acidoterrestris.

Variável	Coeficiente probabilidade	
media	15,7	0,001013
Temperatura	-6,34542	0,000775
Temperatura ²	5,53635	0,001145
pH	-5,30458	0,001109
pH ²	4,04885	0,002138
nisina	5,26292	0,001126
nisina ²	2,28635	0,006658
Brix	5,13792	0,001182
Brix ²	5,58635	0,001125
Temperatura*pH	-3,06813	0,004943
Temperatura*nisina	1,24213	0,029019
Temperatura*Brix	1,60562	0,017701
pH*nisina	2,19438	0,009595
nisina*Brix	1,51813	0,019739

762

763

764

765

766

767

768

769

770

771

772

773 TABELA 5. *Quadro de análise de variância para o modelo quadrático*
 774 *da equação 4.*

Fonte de variação	SQ ^e	gl ^c	QM ^d	Fcal ^a	Ftab ^b
Regressão	4317,149	13	332	4	2,57
Resíduo	1008,5	13	78		
Falta de ajuste	1007	11	92	122	
Erro puro	1,5	2	0,75		
Total	5325,649	26			

775

776 ^aFcal=F calculado, ^bFtab= F tabelado, ^cgl=grau de liberdade, ^dQM=quadrado médio, ^eSQ= Soma de quadrados

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

Figura 1 topo ↑

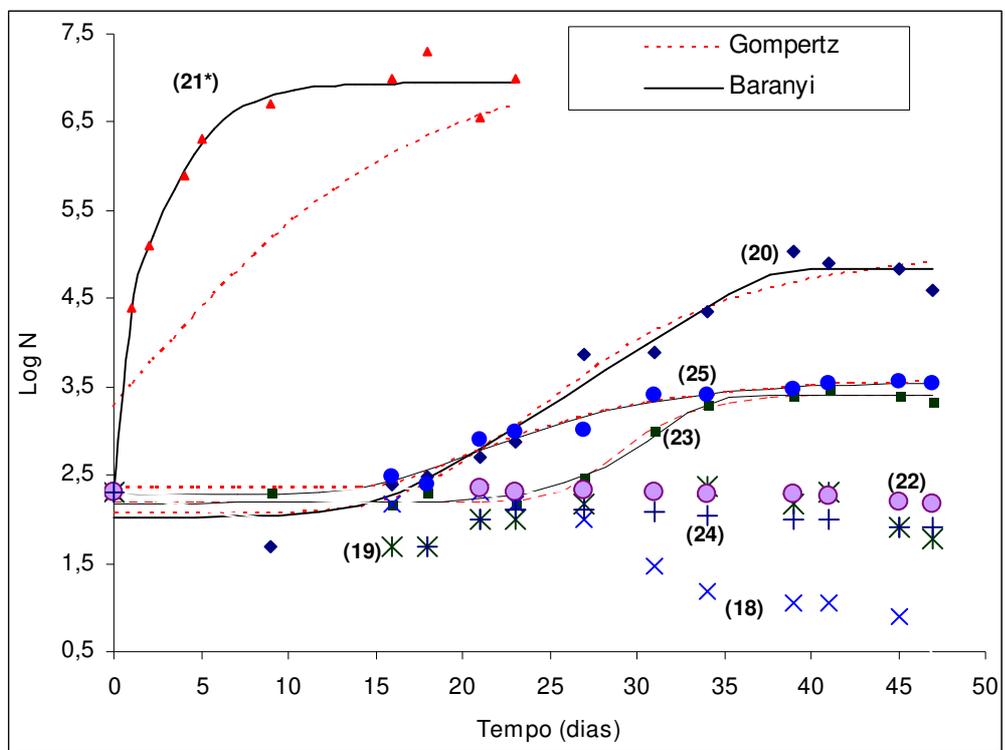
792

793

794

795

796



797

798

799

800

801

802

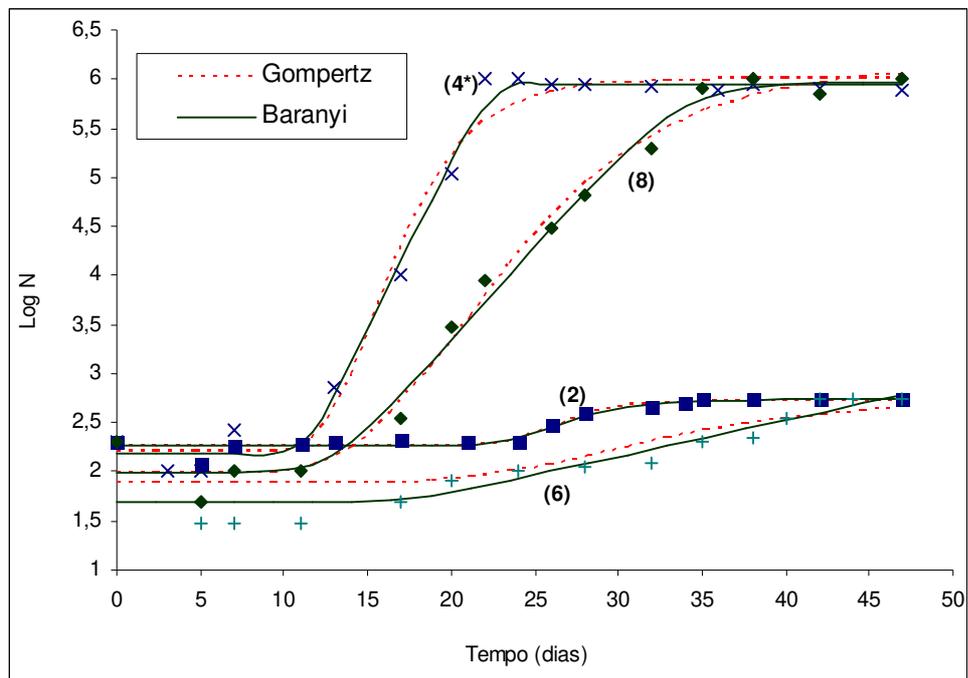
Figura 2 topo ↑

803

804

805

806



807

808

809

810

811

812

813

814

815

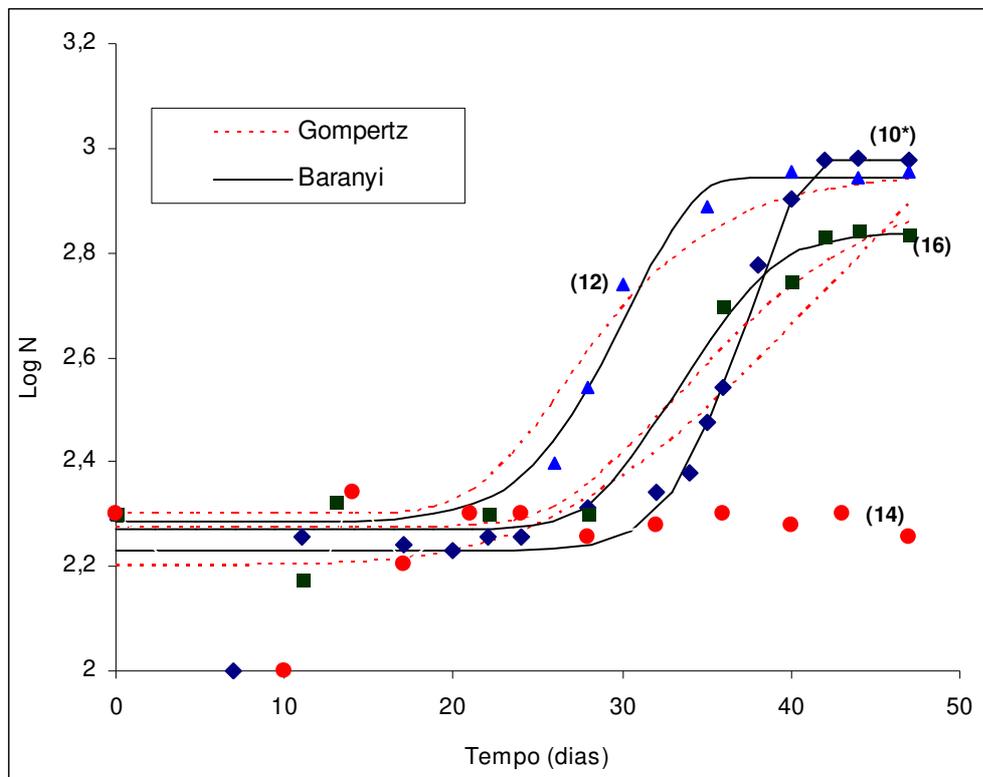
Figura 3 topo ↑

816

817

818

819



820

821

822

823

824

825

826

827

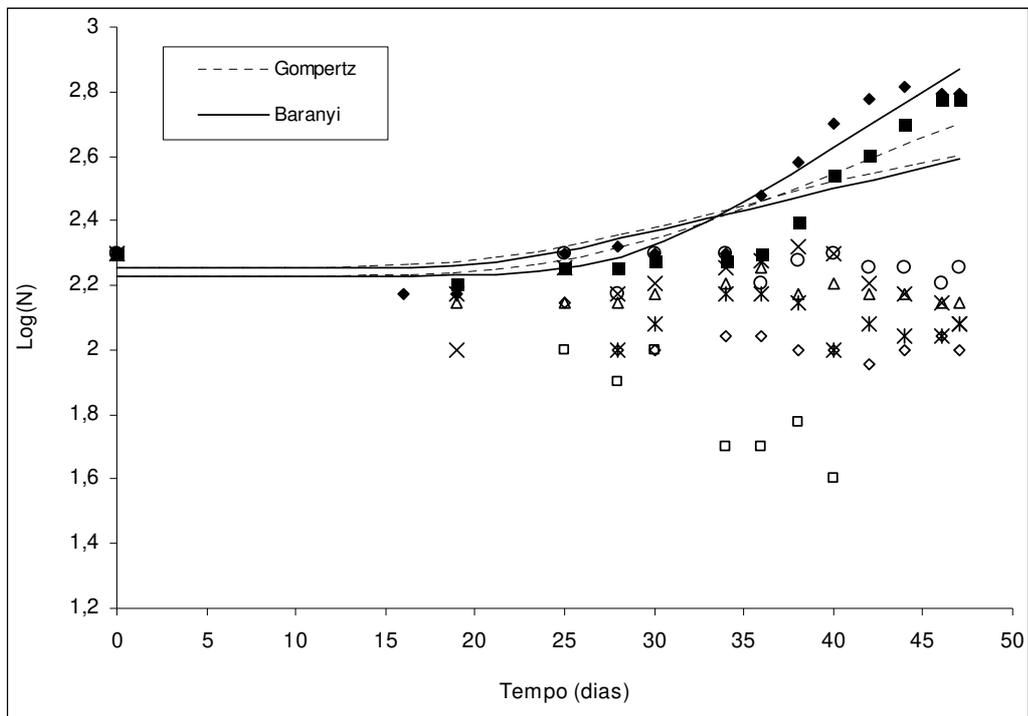
Figura 4 topo ↑

828

829

830

831



832

833

834

835

836

837

838

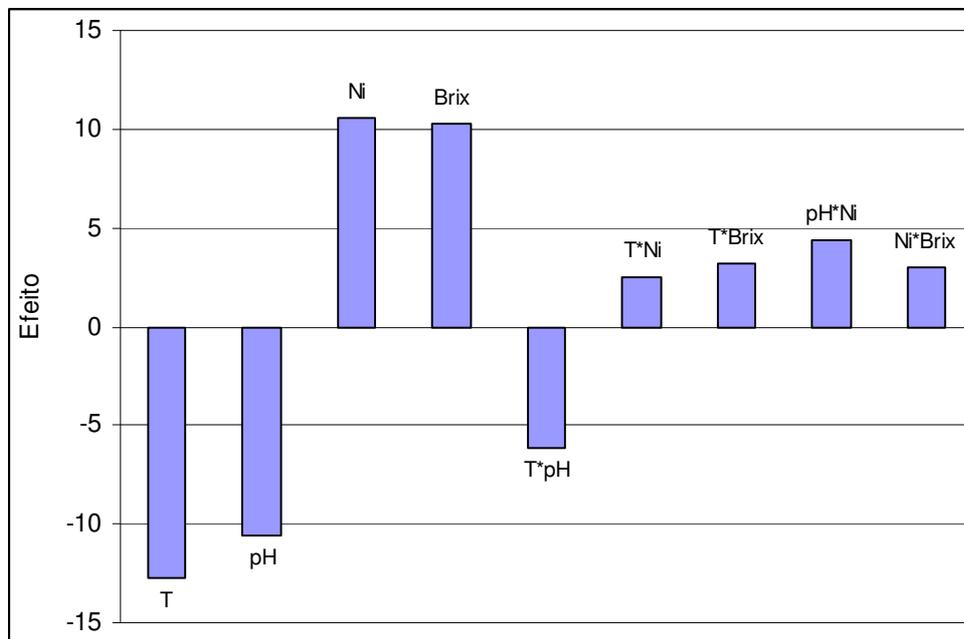
Figura 5 topo ↑

839

840

841

842



843

844

845

846

847

848

849

850

851

Figura 6 topo ↑

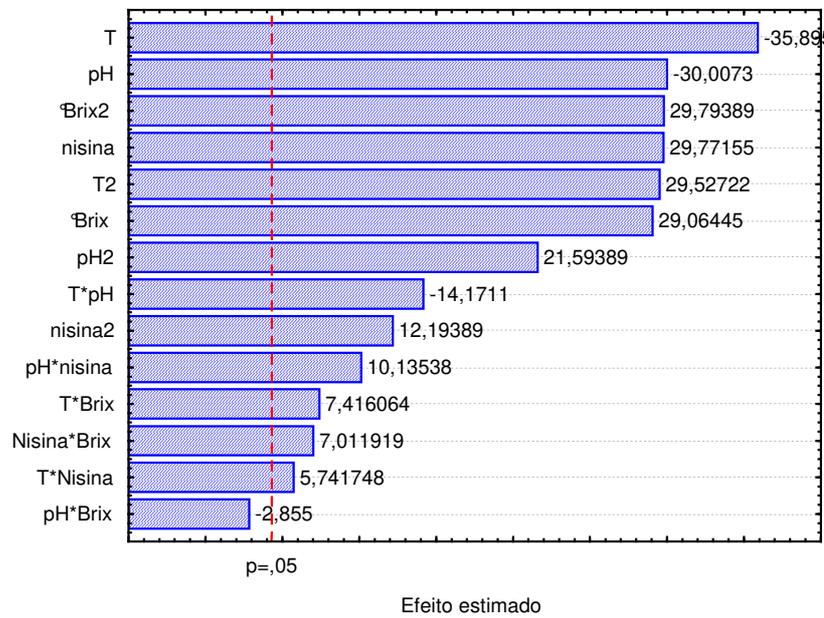
852

853

854

855

856



857

858

859

860

861

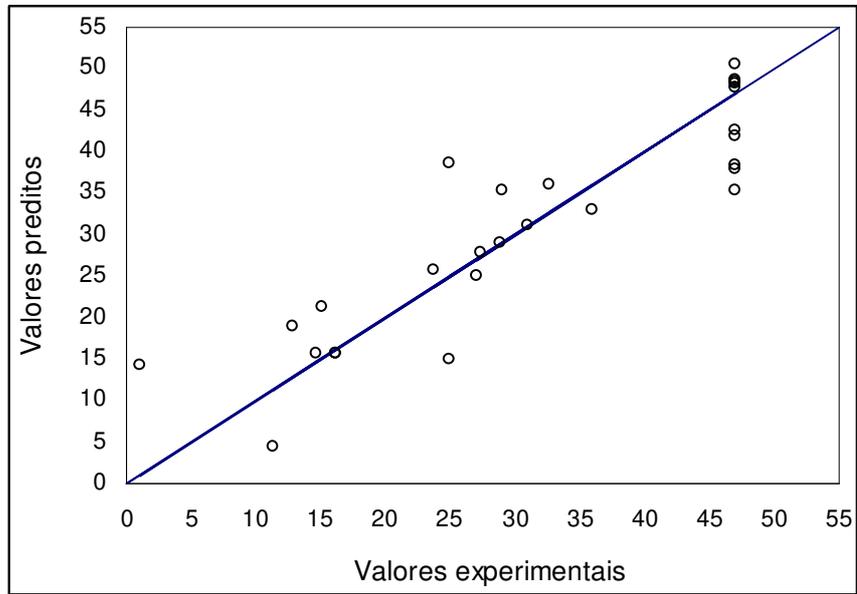
862

863

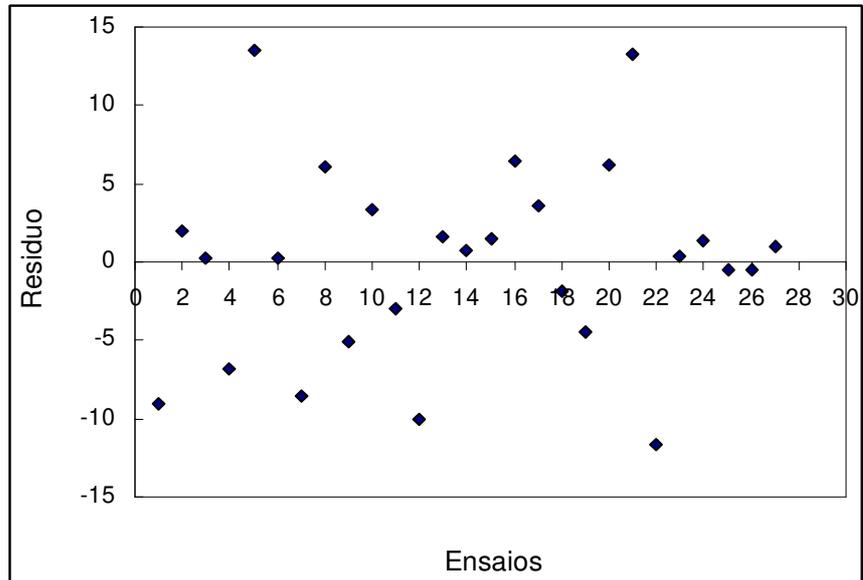
864

Figura 7 topo ↑

865



866



867

868

869

870

871

872

873

874

875

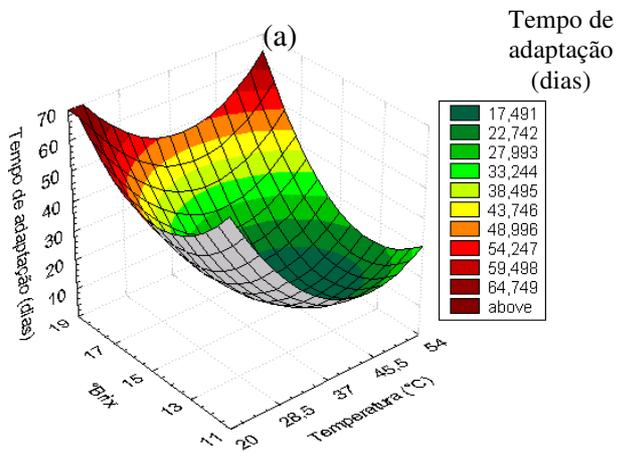
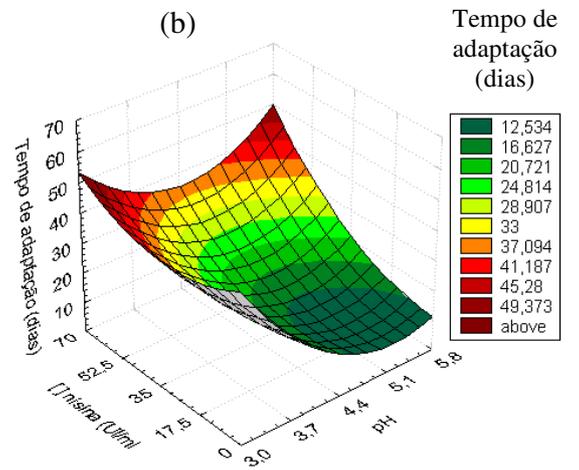


Figura 8 topo ↑



876

877

878

879

880

881

882

883

Figura 9 topo ↑

884

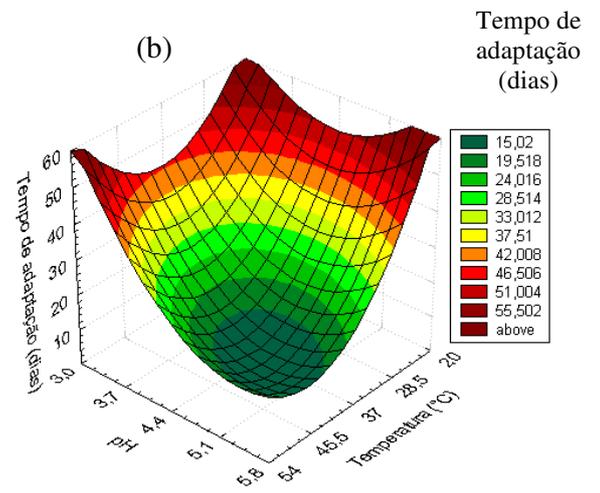
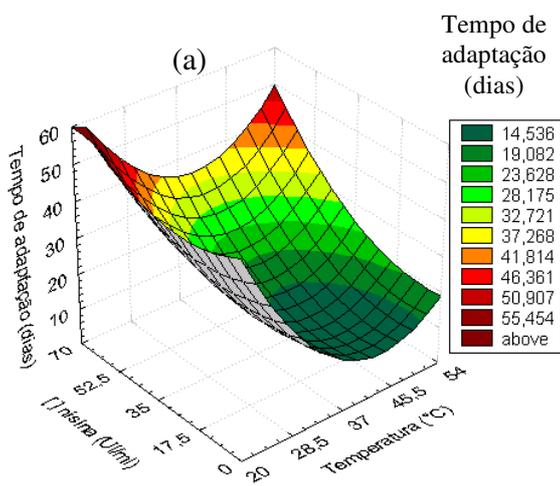
885

886

887

888

889



890

Capítulo 4

**Influência da nisina na resistência térmica de esporos de
Alicyclobacillus acidoterrestris CRA7152 em suco
concentrado de laranja**

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista “Food
Microbiology”**

Influência da nisina na resistência térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco concentrado de laranja

Wilmer Edgard Luera Peña¹ and Pilar Rodriguez de Massaguer²

*Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos
CP 6121, CEP 13083-862
Campinas, SP - Brazil*

Running Title: *A. acidoterrestris* em suco de laranja

²Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food Engineering, Department of Food Science, Cidade Universitaria, CP 6121, CEP: 13083-862. Fax: 19-32894966, Campinas, São Paulo, Brazil, E-mail address: ¹edgardwil@hotmail.com, ²esteril@unicamp.br

Resumo

Foi investigado a efeito da nisina na resistência térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja (64°Brix). Avaliou-se 0, 50, 75 e 100IU de nisina/ml de suco sob temperaturas de 92, 95, 98 e 102°C. O modelo polinomial quadrático foi usado para analisar os efeitos dos fatores e sua interação. Os esporos sobreviventes foram quantificados com plaqueamento em profundidade, em meio K pH 3,7.

Dos resultados, observou-se que os valores D sem adição de nisina foram de 25,5, 12,9, 6,1 e 2,3min para 92, 95, 98 e 102°C respectivamente. Já quando foi adicionada nisina no suco observou-se queda da termorresistência a medida que aumentou a concentração para uma mesma temperatura. Para uma concentração de nisina fixa, o aumento da temperatura diminuiu a atividade deste conservante devido ao efeito que a temperatura possa ter na sua estabilidade. Com 30, 50, 75 e 100 IU/ml a 95°C, os valores D foram de 12,3 11,3 10,4 e 9,4 min respectivamente, mostrando que se pode obter diminuição no valor D em até 27%. O modelo polinomial de segunda ordem implementado com $r^2 = 0,995$ mostrou que a resistência do microrganismo foi afetada pela ação da temperatura seguida pela concentração de nisina. Assim, conclui-se que a nisina é uma opção como coadjuvante para diminuir o rigor do tratamento térmico, tendo como alvo *A. acidoterrestris* CRA 7152.

Introdução

A pasteurização de sucos de frutas ácidas a temperaturas entre 85 a 95°C destrói microrganismos não esporulados tais como leveduras bolores e algumas bactérias não esporuladas. Porém esporos bacterianos podem sobreviver e germinar sobre estas condições ácidas (Blocher e Busta, 1983). Neste sentido *Alicyclobacillus*, microrganismo emergente como deteriorante de sucos de frutas ácidas, tornou-se um novo indicador na qualidade destes produtos. Assim, a sobrevivência deste microrganismo após pasteurização, coloca em risco a qualidade do produto quando estocado em abuso de temperatura ambiente dado a sua característica de mesófilo. O *A. acidoterrestris* é não patogênico, formador de esporos, acidófilo, aeróbio e gram positivo (Walls e Chuyate, 2000). Este microrganismo contém ácido graxo ω -alíciclo como maior componente de ácido graxo da sua membrana, podendo crescer em faixas de pH de 2,5 a 6,0 (Murakami *et al.*, 1998), sendo a deterioração do produto manifestada pela produção de guaiacol (Walls e Chuyate, 1998) e outros componentes fenólicos (Borlinghaus e Engel, 1997). Diferentes valores D (tempo necessário para reduzir a população de esporos viáveis em 90% a uma dada temperatura) deste microrganismo foram reportados na literatura dependendo da cepa e do meio de aquecimento: 50 e 2,7 min para temperaturas de 85 e 95°C respectivamente (Eiroa *et al.*, 1999), 23 e 16 min a 90°C em suco de maçã a 11,4°Brix e suco de uva a 15,8°Brix respectivamente (Splittstoesser *et al.*, 1994), 1,4, 4,8 e 19,9min a 95, 90 e 87°C respectivamente, em suco de maracujá 12°Brix e pH 3,12 (Mc Knight, 2003).

Pontius *et al.* (1998) estudaram o efeito de diferentes ácidos (cítrico, tartárico e málico) na resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris*, mostrando que o valor D mudou com a mudança do pH a baixas temperaturas (88°C) sendo que a alta temperatura o efeito foi menos evidente. Silva *et al.* (1999) mostraram que a resistência térmica de *A. acidoterrestris* foi afetada pela temperatura seguida pela concentração de sólidos solúveis e pH, usando meio laboratorial; o modelo encontrado não realizou boas previsões quando utilizado em sistemas de alimentos, indicando que um modelo implementado a partir de dados gerados em meios laboratoriais não pode ser usado diretamente para estimar a resistência térmica em alimentos. A resistência térmica é uma característica de microrganismos deteriorante de alimentos e altamente influenciada pelo meio de aquecimento, sendo esta informação importante para desenhar um processo de pasteurização.

A nisina, polipeptídeo antibacteriano possui grande atividade contra bactérias gram positivas (Delves-Broughton, 1990), e o tratamento térmico que inativa estes microrganismos pode encontrar neste conservante um efeito aditivo, quando empregado em conjunto com o aquecimento (Adams e Nizo, 2003). Alguns estudos já foram realizados com esporos bacterianos. Assim, temos que a presença de nisina durante o aquecimento mostrou aumento da letalidade do processo frente a esporos de *Bacillus cereus* e *A. acidoterrestris* (Beard *et al.*, 1999; Komitoupoulou *et al.*, 1999; Wandling *et al.*, 1999 e Penna e Moraes, 2002). Yamazaki *et al.* (2000) obtiveram até 24% de redução do valor D a 90°C usando 200IU de nisina/ml em bebida de laranja.

O concentrado de laranja (ao redor de 65ºBrix) de diversas origens que se comercializa em grandes quantidades no mercado mundial mostrou presença de esporos viáveis de *Alicyclobacillus* em níveis de até $6,4 \times 10^2$ UFC/ml (Pinhatti *et al.*, 1997). Assim, estudos de inativação destes esporos neste tipo de produto torna-se importante, para diminuir esta carga inicial, já que o suco depois de reconstituído (ao redor de 11ºBrix) fica susceptível a deterioração por este microrganismo em condições de abuso.

O objetivo desta pesquisa foi estudar o efeito da temperatura de pasteurização (92 a 102ºC) e concentração de nisina (0 a 100IU/ml) na resistência termoquímica indicada pelo valor D de *A. acidoterrestris* em suco concentrado de laranja (64ºBrix) utilizando modelo quadrático para análise dos dois fatores e sua possível interação.

Materiais e Métodos

Cepa bacteriana e meios de cultura.

Foi usada uma cepa de *A. acidoterrestris* CRA 7152 reconhecidamente deteriorante e produtora de guaiacol, gentilmente cedida pela Danisco Cultor.

Meio de esporulação: *Alicyclobacillus acidocaldarius médium* (AAM): 0,05 % de $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$; 1,5 % de agar; 1,0g de Extrato de levedura; 0,2g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,25g de $Ca Cl_2 \cdot 2 H_2O$; 0,60g de KH_2PO_4 1,0g de glicose; 1,0l de água . O pH foi ajustado para 4,0 (Murakami *et al.*, 1998).

Meio de quantificação K: Peptona(Oxoid) 5g; Glicose 1g; Extrato de levedura (Oxoid) 2,5g; Tween-80 1g; Agar 15g; Água destilada 1.0l.

Esterilizado a 121°C por 15 minutos. O pH ajustado para 3,7 com ácido málico 25% esterilizado com microfiltro de 0,22mm (Walls e Chuyate, 1998).

Preparação da suspensão de esporos.

Inicialmente foi realizado crescimento de células de *A. acidoterrestris* em 4 tubos inclinados contendo meio PDA (Oxoid) (Potato Dextrose Agar, pH = 5,6), incubados a 44°C por 3 dias. Posteriormente o crescimento nos tubos foi recolhido através de raspagem com baguetas estéreis de vidro utilizando 5ml de água destilada estéril por tubo. A suspensão obtida foi transferida para um tubo de rosca de vidro de 25x200mm estéril e ativada a 80°C por 10 minutos, seguido de resfriamento rápido em banho de gelo. Inoculou-se 0,1ml da suspensão ativada em 100 garrafas de vidro de 290ml contendo 60,0ml de meio (AAM) solidificado e inclinado (Yamazaki *et al.*, 1996). As 100 garrafas inoculadas foram então incubadas por 9 dias a 45,0°C. Após observação microscópica de 90% do campo esporulado via coloração de esporos utilizando corante verde de malaquita, foi realizada a coleta dos esporos (Murakami *et al.*, 1998). Os esporos coletados foram lavados, e re-suspendidos em água destilada estéril após 3 centrifugações (12310g/15 min a 4°C), seguido de lavagens alternadas, com adição de lisozima 0,3mg/ml de suspensão após a primeira lavagem e ajuste de pH até 11 para eliminação das células vegetativas (Stumbo, 1965). Os esporos foram estocados a 4°C em água destilada estéril até seu uso. A contagem foi feita em meio K formulado após ativação térmica por 10 minutos a 80°C com plaqueamento em profundidade e as placas invertidas incubadas a 43°C por 5 dias. A concentração final da suspensão de esporos foi de 8×10^8 esporos/ml.

Estudo da resistência termoquímica

A resistência do *A. acidoterrestris* foi determinada utilizando-se tubos TDT estéreis preenchidos com 1,9 ml de suco concentrado de laranja e 0,1 ml de suspensão de esporos, seguido de homogeneização (Stumbo, 1965). Os tubos foram selados com maçarico e colocados em banho termostático (Polystat® com $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de precisão), previamente ajustada às temperaturas correspondentes da Tabela 1. O tempo de atraso do tubo até a temperatura desejada foi determinado previamente, utilizando um termopar tipo flexível de fio OMEGA duplex TT-T36, para monitorar a temperatura. Este tubo TDT foi preenchido com 1,9 ml de suco concentrado e 0,1 ml de água, posteriormente selado. Para cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente em banho de gelo, até temperatura ambiente.

Os tubos foram abertos assepticamente, em seguida foram realizadas diluições decimais sucessivas, e inoculadas alíquotas de 1ml em profundidade com meio K pH 3,7 em duplicata. As placas foram incubadas invertidas a 43°C , e a contagem das colônias foi realizada durante 3 a 5 dias (Walls e Chuyate, 1998). A contagem foi expressa em esporos sobreviventes/ml.

Planejamento experimental

Inicialmente foram determinados os parâmetros de resistência térmica (valores D e z) dos esporos de *A. acidoterrestris* no concentrado de laranja sem adição de conservante. Em seguida realizou-se um teste para determinar a concentração de nisina máxima que minimize o valor D da bactéria, assim foram determinados

valores D a 95°C com 0, 30, 50, 75, 100 e 150 IU/ml utilizando o método do tubo TDT (Stumbo, 1965) como critério para escolher a concentração de nisina mais adequada. Usou-se suco concentrado de laranja com °Brix final de 64 e pH de 3,68 normalmente praticado pela indústria. Depois de determinada a concentração máxima de nisina a ser empregada, implementou-se um fatorial completo para dois fatores com quatro níveis cada um: temperatura (92, 95, 98 e 102°C); essas temperaturas foram selecionadas de acordo à faixa de uso industrial para pasteurização de suco concentrado de laranja. A concentração de nisina foi estudada até a máxima concentração selecionada (0, 50 75 e 100IU/ml) como mostrado na Tabela 1. As amostras utilizadas foram tratadas termicamente a 105°C por 10min para eliminar presença de possíveis competidores (Massaguer et al., 2002). A Nisina™ foi cedida pela Danisco Cultor e usada após preparo de uma solução estoque contendo 10⁴ IU/ml em HCl 0,02 N e esterilizada a 121°C durante 15 minutos (Scott e Taylor, 1981). A carga inicial inoculada de *A. acidoterrestris* CRA 7152 foi da ordem de 10⁶ esporos/ml de suco concentrado de laranja.

Tabela 1

Para análise das respostas do planejamento fatorial implementado, os dados foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem (equação 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 \quad (1)$$

Onde X₁=Temperatura (°C), X₂=concentração de nisina (IU/ml), β₀...β₅ coeficientes do modelo e Y=Valor D (min).

Avaliação dos dados e geração do modelo quadrático

Com os dados das contagens de sobreviventes, foram construídas curvas de sobrevivência realizando regressão do log de sobreviventes contra o tempo em minutos. Os valores D foram determinadas como o inverso negativo da inclinação da curva de sobreviventes. O valor z (número de °C necessário para reduzir o valor D em um décimo) foi calculado como o inverso negativo da inclinação da curva do Log de D versus temperatura.

Com esses valores D calculados, foi usado o Software SAS versão 8.0 (Anova, opção modelos polinomiais), para gerar um modelo de superfície de resposta e analisar o efeito de cada fator e sua interação. O bom ajuste do modelo foi validado estatisticamente pelo coeficiente de determinação (R^2) e o teste de F. O desvio relativo para cada predição foi calculado usando a expressão da equação 2:

$$DR = \left[\frac{(x_p - x_0)}{x_0} \right] \quad (2)$$

Onde x_p é o valor predito e x_0 é o valor observado. O fator bias e o fator exatidão também foram calculados seguindo o procedimento de Ross (1996).

Resultados e Discussão

Determinação do Valor D e z de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja

As curvas de sobreviventes log (esporos sobreviventes/ml) versus tempo, mostrados pela Figura 1, não exibiram ombro, observando-se comportamento linear (Análise estatística ver Anexo). Isto também foi reportado por Previdi *et al.*

(1997); Pontius *et al.* (1998); Silva *et al.* (1999) e Murakami *et al.* (1998). Os tempos de aquecimento foram desenhados para conseguir até 4 ciclos log de redução. Os valores D encontrados nesta pesquisa foram de 25,5 min a 92°C; 12,8 min a 95°C; 6,2 min a 98°C e 2,0 min a 102°C. Estes valores foram maiores do que os encontrados na literatura ($D_{95^{\circ}\text{C}}=2,7\text{min}$ cepa DSM2498 (Eiroa *et al.*, 1999)), isto era esperado já que nesta pesquisa foi usado suco concentrado (64°Brix) e no caso de Eiroa *et al.* (1999) suco simples ao redor de 11°Brix. É bem reconhecido que a resistência térmica de esporos bacterianos depende do meio na qual estes são aquecidos. Assim, esporos manifestam um aumento da resistência térmica quando equilibrados em baixa atividade de água ou resuspendidos em uma solução de alto potencial osmótico (Gombas, 1983). Uma explicação desse mecanismo osmoregulativo é a hipótese de que altas concentrações de açúcares como a sacarose, exercem uma pressão osmótica similar ao que existe no córtex do esporo. Esta pressão induz mecânica e osmoticamente a desidratação do protoplasto, sendo esta desidratação o mecanismo presente nos esporos assumido como responsável pela resistência ao calor (Bhothipaksa e Busta 1978). Esporos de várias espécies incluindo as sensíveis ao calor e cepas mutantes de *Bacillus cereus* com menos ácido dipicolínico (DPA), aumentaram sua resistência ao calor quando presentes em meios contendo elevadas concentrações de açúcares (Bhothipaksa e Busta, 1978). Da mesma forma a sensibilidade de esporos de *Clostridium perfringens* ao aquecimento por irradiação pode ser mascarado quando estes forem aquecidos em uma solução com elevado potencial osmótico seja com sacarose ou com glicerol (Gomes *et al.*, 1980). Splittstoesser *et al.* (1998), reportaram considerável

aumento no valor $D_{95^{\circ}\text{C}}$ de *Alicyclobacillus* cepa WAC de 1,9min para 12min quando o Brix passou de 16 para 65 em suco de uva. A influência de fatores do meio de aquecimento tais como pH, A_w , composição, etc., na resistência térmica de esporos bacterianos está bem documentada na literatura, sendo assim, nossos resultados obtidos mostraram que a dificuldade de destruir os esporos é maior em suco concentrado do que em sucos simples.

Figura 1

Com esses valores D obtidos foi calculado o valor z de $9,06^{\circ}\text{C}$, como mostrado pela Figura 2, este valor é o normalmente reportado pela literatura para este microrganismo. Splittstoesser *et al.* (1998) obtiveram valores z de $6,9^{\circ}\text{C}$ a 16°Brix e $7,4^{\circ}\text{C}$ a 65°Brix , cepa WAC.

Figura 2

Determinação da concentração máxima de nisina

Os resultados da aplicação do efeito de diferentes concentrações de nisina no valor D a 95°C em suco concentrado (64°Brix) estão mostrados na Tabela 2. Observou-se que houve uma ligeira queda da resistência com adição de 30IU/ml representando apenas 4,04%, com relação à resistência obtida no branco (0IU/ml) e, a medida que a concentração de nisina no suco foi aumentando a queda do valor de D foi se manifestando. Isto foi mais evidente até 100IU (26,22% de redução no valor D), acima deste valor (150IU/ml) não houve diferença significativa de queda da resistência térmica em relação a 100IU/ml, indicando que o acréscimo na concentração não melhorou a taxa de redução. Komitopoulou *et al.* (1999) utilizando a cepa *A. acidoterrestris* CRA 7182 em suco de maçã pH 3,51

e 50IU/ml no suco, mostraram reduções ao redor de 40% no valor D a temperatura mais baixa de 80°C e de apenas 15% de redução para 95°C. Yamazaki *et al.* (2000) reportaram redução de 24 e 29% no valor D de *A. acidoterrestris* AB-5 a 90°C em bebida de laranja e maçã respectivamente.

Tabela 2

Observa-se pela Tabela 2 uma tendência de queda no valor D, que se estabilizou com aproximadamente 100IU/ml, uma concentração maior a esta, significaria incorporação de maior custo, sem aumento significativo na redução do valor D.

Segundo Muriana (1996) na maioria das aplicações de bacteriocinas, a redução do alvo bacteriano pode ser descrita como modesta; presume-se que, durante o tratamento térmico todas as células estejam expostas a mesma temperatura, porém o tamanho macromolecular das bacteriocinas usadas em alimentos (4000 a 8000 Da) dificulta fisicamente a ligação entre as moléculas para obter efeitos muito eficazes. O tamanho relativamente grande das bacteriocinas, e seu caráter protéico as tornam susceptíveis a reações bioquímicas que implicam em cadeias colaterais de aminoácidos ou em interações hidrofóbicas que podem dificultar as ligações com o alvo microbiano. Sendo assim, é possível assumir que, depois de uma determinada concentração de nisina, o aumento desta dificultaria o “espaço físico” de entrada de sua molécula no microrganismo alvo, diminuindo então seu efeito inibidor.

Assim, foi escolhido 100IU/ml de nisina como máxima concentração a ser testada no experimento.

As Figuras 3 a 6 apresentam as curvas de sobreviventes a 92, 95, 98 e 102°C com 0, 50, 75 e 100IU/ml de nisina. Foi observado o comportamento linear em todas as curvas. A 92°C houve maior redução da resistência térmica para todas as concentrações testadas de nisina (Figura 3). Com 100, 75 e 50IU/ml de nisina conseguiu-se 29,13, 21,06 e 10,31% de redução no valor D, respectivamente.

Figura 3

A 95°C, foi observado comportamento similar ao de 92°C, pois reduções de 12, 18,41 e 26,22% para concentrações de nisina de 50, 75 e 100IU/ml foram obtidas respectivamente (Figura 4). Para 98°C (Figura 5) 22,71% de redução no valor D foi verificado com 100IU/ml. Quando foi adicionado 50 e 75 IU/ml de nisina no suco, 9,87 e 16,93% de redução, respectivamente, na população foi verificado.

Figura 4

Figura 5

As menores porcentagens de redução foram encontradas para o caso de aquecimento a 102°C (Figura 6). Assim, para 100IU/ml, 21% de redução do valor D foi registrado. A adição de 75 e 50IU de nisina/ml no suco resultou em 18 e 9% de redução na respectiva população inoculada.

Figura 6

A Tabela 3 apresenta um resumo dos valores D calculados para o planejamento fatorial da Tabela 1, com as respectivas reduções em termos de porcentagens. Observa-se que o efeito da nisina é mais evidente quanto menor a temperatura testada (92°C), diminuindo a medida que a última é aumentada. A uma mesma concentração de nisina, a sensibilidade ao calor foi mais pronunciada a baixas temperaturas (92°C) onde a redução do valor D foi de 29, 21 e 10% para 100, 75 e

50 IU/ml de nisina aplicada, respectivamente. Komitopoulou *et al.* (1999) encontrou resultados semelhantes, onde a sensibilidade dos esporos de *A. acidoterrestris* foi mais pronunciada a menores temperaturas testadas. Já Jeknic *et al.* (1996) mostraram que existe alteração na atividade da nisina quando exposta a altas temperaturas.

Tabela 3

Usando a equação 3 pode ser calculado o tempo de processo a 102°C para obter 5 reduções decimais, com e sem nisina:

$$F = D_{102^{\circ}C} \gamma \quad (3)$$

Assim:

$$F = 2,01 \text{ min} * 5 = 10 \text{ min sem nisina}$$

$$F = 1,59 \text{ min} * 5 = 7,9 \text{ min com 100IU de nisina/ml de suco.}$$

Onde F é o tempo de processo; $D_{102^{\circ}C}$ é o valor D a 102°C e γ as reduções decimais.

Yamazaki *et al.* (1997) mostraram que a adição de lysozyme (10ppm) contribuiu em 30% para reduzir a resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris* AB-1, em tampão de citrato (pH 4,0) quando comparado com o controle (0ppm) aquecido a 89°C. Yamazaki *et al.* (2000) conseguiram reduzir a resistência térmica destes esporos (cepa AB-5) para 29% e 24% em suco de maçã clarificado e bebida de laranja respectivamente quando adicionado 200IU/ml de nisina. No presente estudo a resistência térmica dos esporos de *A. acidoterrestris* CRA 7152 foi reduzida em 29,4, 26,21, 22,73 e 20,90% a temperaturas de 92, 95, 98 e 102°C, respectivamente, com adição de 100UI/ml de nisina. Observa-se então, que o

efeito inibidor da nisina frente aos esporos de *A. acidoterrestris* é semelhante ao lysozyme, porém com mecanismo de ação diferente. Vale acrescentar que o efeito antimicrobiano da lysozyme se perderá depois da pasteurização do alimento devido a ser lábil frente ao calor, enquanto que a da nisina se manterá constante devido a sua maior estabilidade a altas temperaturas e pH ácido (Davies *et al.*, 1998). Em outro estudo, Pontius *et al.* (1998) estudaram o efeito do ácido málico, cítrico e tartárico na resistência térmica destes esporos. Os autores encontraram que o tipo de ácido não foi estatisticamente significativo nas temperaturas estudadas (91 a 97°C) e altos valores D foram obtidos para as cepas VF, WAC, e IP, tão igual ou maior quanto aos reportados por Splittstoesser *et al.* (1994) para estas mesmas cepas bacterianas, que em termos de redução da resistência térmica nada acrescentaram.

O valor z (Figura 7) não foi influenciado fortemente pela presença da nisina; apenas um aumento de até 0,5°C foi observado (100IU/ml, z=9,49°C) quando comparado com o controle (z=9,06°C). Valores de z para este microrganismo encontram-se na literatura variando de 6,4 (Previdi *et al.*, 1997) a 13,8 (Komitopoulou *et al.*, 1999) dependendo da natureza do produto (laboratorial ou alimento), da linhagem do microrganismo, do pH e da presença ou não de conservante.

Figura 7

Análise dos resultados via modelo quadrático.

Pelos dados mostrados na Tabela 3 observou-se que os valores D ficaram entre 25,56min (T=92°C e 0IU/ml de nisina) e 1,59min (T=102°C e 100IU/ml de nisina).

A regressão do modelo polinomial de segunda ordem da equação 1 foi usado para analisar o efeito dos fatores significativos e sua combinação, no valor D.

A Figura 8 (gráfico de Pareto) mostra os efeitos padronizados dos parâmetros no valor D. Este efeito foi definido como o coeficiente da variável de interesse estimado dividido pelo erro padrão (β_1/Sei). Qualquer efeito que excedeu a linha vertical ($p=0,05$) foi considerado significativo. Assim, os seguintes fatores em ordem decrescente de importância tiveram efeito significativo: T, T^2 , Nisina, e TxNisina. Este gráfico indicou que a resistência do microrganismo é mais afetada pela ação da temperatura do que pela concentração de nisina.

Figura 8

Com os dados de Valores D mostrados na Tabela 3 aplicou-se o procedimento de ajuste polinomial quadrático usando o Software SAS v.8.0 e foi obtida a equação 4 cujos coeficientes e nível de probabilidade (0,05) estão apresentados na Tabela 4

$$D = 2081,5333 - 40,3924 * T - 0,6982 * Ni + 0,00688 * Temp * Ni + 0,1961 * Temp^2 \quad (4)$$

Onde:

D=valor D (min); Ni=concentração de nisina (IU/ml); Temp=temperatura (°C).

Tabela 4

Observou-se que tanto a temperatura como a concentração de nisina foram altamente significativas ($p<0,05$) no nível linear, já no nível quadrático apenas a temperatura foi significativa; a interação entre ambos os fatores também resultou ser significativa ($p<0,0001$).

A Figura 9 mostra a superfície de resposta para D vs (T, nisina). Como esperado, a temperatura foi o fator com maior impacto no valor D: um pequeno incremento de temperatura pode causar um decréscimo considerável em D. O valor D diminuiu levemente com o aumento da concentração de nisina, principalmente a baixas temperaturas. Em temperaturas maiores como a de 100°C, a adição de nisina 100IU/ml ou mais não causou maior perda da resistência, obtendo-se um valor D de 1,5min a 102°C.

A curvatura na superfície da Figura 9 foi pelo efeito quadrático da temperatura (T^2 foi altamente significativo). O valor D variou linearmente com o aumento da concentração de nisina.

Figura 9

O modelo polinomial de segunda ordem teve um ajuste altamente significativo ($r^2 = 0,995$, F de 572,7 e $p < 0,0001$). Os desvios relativos para cada valor D predito (Figura 10) mostraram-se em geral aleatoriamente distribuídos ao redor de “0”, não mostrando desta forma uma tendência sistemática nas predições, corroborado pelo fator bias de 0,999. O fator exatidão do modelo apresentado pela equação 4 ficou em 1,089, mostrando um certo grau de desvio em média de até 8,9% nas predições dos valores experimentais. Observou-se maior variabilidade nos ensaios de 13 a 16 correspondentes ao tratamento de 102°C. Isto pode ser devido à imprecisão ao analisar-se dados pequenos, onde uma pequena variação dos mesmos produz maior variabilidade no erro, ou até mesmo a imprecisão do método de determinação da termorresistência quando pequenos valores de D são determinados.

Figura 10

A falta de dados na literatura de resistência termoquímica em concentrado de laranja dificultam uma maior discussão de nossos resultados. Porém, fica demonstrado que o modelo encontrado pode ser usado na implementação de tratamento térmico, tendo como alvo a destruição de esporos de *A. acidoterrestris* apenas para suco concentrado nas mesmas condições estudadas. Silva *et al.* (1999) implementaram um modelo polinomial para estudar o efeito de sólidos solúveis, pH e temperatura na resistência térmica de esporos de *A. acidoterrestris* utilizando meio laboratorial, que quando aplicado para sistema de alimento (extrato de cupuaçu e suco de laranja) acusou falha nas predições de até 100% de diferença; mostrando que quando o objetivo é implementar modelos para processos específicos é recomendável gerá-lo a partir de dados obtidos no próprio produto em questão.

O importante da presente pesquisa foi mostrar que a inclusão da nisina no suco durante o aquecimento aumentou a sensibilidade do microrganismo levando a um aumento da letalidade da pasteurização. Considerando que este conservante é atóxico (Jay, 1994; Franco e Landgraf, 2003) nas condições de uso em alimentos, pode ser usado e ser percebido como um preservativo natural em alimentos, suportando a demanda do consumidor pelo “mais natural”. Seu emprego como parte de um sistema de barreiras múltiplas torna-se então interessante. Uma limitação quando usada como coadjuvante do tratamento térmico é que uma certa proporção da nisina é perdida como resultado do aquecimento e as interações com as características do alimento como pH, A_w , etc (Thomas *et al.*, 2000). Assim níveis de adição de nisina deverão ser ajustados para compensar essa perda. Por exemplo, durante o processamento de queijo existe uma perda típica de 15 a 20%

dependendo da intensidade do tratamento térmico aplicado e do pH do produto, sendo que a melhor retenção é conseguida em valores de pH ácido. No caso de processamento UHT, essa perda da atividade de nisina pode chegar até 40%. Entretanto, após o processo, poucos esporos permaneceram e menor quantidade de nisina residual poderá ser requerida levando em conta o efeito da temperatura individualmente. Além disso, os tratamentos UHT danificam os endósporos tornando-os mais sensíveis à nisina (Delves-Broughton, 1996).

Dos resultados conclui-se que os valores D do *A. acidoterrestris* obtidos em suco concentrado mostraram-se bem maiores dos encontrados na literatura para sucos simples.

A nisina é uma opção como coadjuvante do tratamento térmico na redução da resistência térmica destes esporos, conseguindo-se 29%, 26%, 23% e 21% de redução do valor D a 92, 95, 98 e 102°C respectivamente quando 100IU de nisina/ml de suco foi adicionada. Maiores concentrações não alteram esse resultado. O processo de pasteurização de suco concentrado de laranja a 102°C poderá reduzir-se de 6min sem nisina para 4,7min com adição de 100IU/ml e conseguir 5 reduções decimais de esporos de *A. acidoterrestris*.

O modelo quadrático obtido descreveu bem os dados de valor D em função da temperatura e concentração de nisina, mostrando como fator principal a temperatura seguida da concentração de nisina. A dependência linear foi mostrada por ambos os fatores, já a quadrática apenas para a temperatura.

A relação obtida pode ter aplicação prática para a indústria processadora de sucos cítricos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp pelo apoio financeiro. A indústria SucoRico S.A. pelo fornecimento das amostras de suco concentrado de laranja. A Danisco Cultor do Brasil pelo fornecimento da nisina.

Revisão bibliográfica

Adams, M., Nizo, E.S. (2003). Nisin in multifactorial food preservation, chapter 2, In: Sibel Roller, Natural antimicrobials for the minimal processing of foods, CRC, Boston.

Beard, B.M., Sheldon, B.W., Foegeding, P.M. (1999). Thermal resistance of bacterial spores in milk-based beverages supplemented with nisin. *J. food protect*, 62, 484-491.

Bhothipaksa, K., Busta, F.F. (1978). Osmotically induced increase in thermal resistance of heat-sensitive, dipicolinic acid-less spores of *bacillus cereus*, Ht-8. *App. Environ. Microbiol.* 35, 4, 800-808.

Blocher, J.C., Busta, F.F. (1983). Bacterial spore resistance to acid. *Food Technol*, November, 87-99.

Borlinghaus, A., Engel, R. (1997). Alicyclobacillus, incidence in commercial Apple juice concentrate (AJC) supplies-method development and validation. *Fruit processing*, 7, 262-266.

Davies, E.A., Bevis, H.E., Potter, R., Harris, J., Williams, G.C., Delves-Broughton. (1998). J. The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. *Lett. Appl. Microbiol*, 27, 186-187.

- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44(11), 100-117.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.E., Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Anton. Von. Leuwen*, 69, 193-202.
- Eiroa, M.N.V., Junqueira, V.C.A., Schmidt, F. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *J. food protect.* 62(8), 883-886.
- Franco, B.G.M., Landraf, M. (2003). *Microbiologia dos Alimentos*, (Editora Atheneu), 182p São Paulo.
- GOMBAS, D.E. Bacterial spore resistance to heat, *Food Technology*, v.11, p.105-110, 1983.
- Gomez, R.F., Gombas, D.E., Herrero, A. (1980). Reversal of radiation-dependent heat sensitization of *Clostridium perfringens* spores. *Appl. Environ. Microbiol*, 39, 525.
- Jay, J.M. (1994). *Microbiologia moderna de los Alimentos*, tercera edición, (Editorial Acribia) 804p Zaragoza España,
- Jeknic, T.M.; Gould, S.E.; Daeschel, M.A. (1996). Structural analysis of thermally inactivated nisin. IFT annual meeting: book of abstracts, p.30 ISSN 1082-1236.
- Komitopoulou, E., Bozaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *J. Food Sci. and Technol*, 34, 81–85.
- Massaguer, P.R., Pacheco, P.C., Atarassi, M.M., Peña, W.L., Gonçalves, A.C., Paula, N.A., Geraldini, L.H., Liossi, L.L., Gagliazzi, M.R., Guerra, V.A. 2002. Sensibility and Specificity of Methods for *Alicyclobacillus* Detection and Quantification: A collaborative study. *Fruit Processing*, 11, 478-482.

Mc KNIGHT, I.C.S. (2003). Isolamento e identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a partir de sucos de maracujá e abacaxi pasteurizados, e determinação da resistência térmica de seus esporos (Tese de Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.

Murakami, M., Tedzuka, H., Yamazaki, K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiol.* 15, 577-582.

Muriana, P.M. (1996). Bacteriocins for control of *Listeria* spp. In Food. *J. Food Protect.*, supplement, 54-63.

Penna, T.C.V., Moraes, D.A. (2002). The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. *J. food protect.* 65, 415-418.

Pinhatti, M.E.M.C., Variane, S., Eguichi, S.V., Manfio, G.P. (1997). Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit processing*, 9, 350-353.

Pontius, A.J., Rushing, J.E., Foegeding, P.M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *J. food protect.* 16(1), 41-46.

Previdi, M.P., Quintavalla, S., Lusardi, C., Vicini, E. (1997). Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices. *Indust. Conserve*, 72, 353-358.

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol*, 81, 501-508.

Scott, V.N., Taylor, S.L. (1981). Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *C. botulinum* spores. *J. food Sci.*, 46, 121-125.

- Silva, F.M., Gibbs, P., Margarida, C.V., Silva, C.L.M. (1999). Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *Int. J. Food Microbiol.* 51, 95-103.
- Splittstoesser, C., Lee, Y., Churey, J.J. (1998). Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 18(9), 585-587.
- Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J. food protect*, 57(12), 1080-1083.
- Stumbo, C.R. (1965). *Thermobacteriology in food processing*, Academic press, New York, 236.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., Delves-Broughton, J. (2000). Nisin chapter 18, In: *Natural food antimicrobial system* edited by Naidu, A.S. CRC press London.
- Walls, I., Chuyate, R. (1998). *Alicyclobacillus*-Historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy, Food and environ. Sanit.*, 18(8), 499-503.
- Walls, I., Chuyate, R. (2000). Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Aus.*, v(7), 286-288.
- Wandling, L.R., Sheldon, B.W., Foegeding, P.M. (1999). Nisin in milk sensitizes bacillus spores to heat and prevent recovery of survivors. *J. food protect*, 62, 492-498.
- Yamazaki, K., Isoda, C., Hedzuka, H., Kawai, Y., Shinano, H. (1997). Thermal resistance and prevention of spoilage bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic beverages. *Nippon Shokunin, Kagakun Kaishin*, 44, 905-911.

Yamazaki, K., Murakami, M., Kawi, Y., Inoue, N., Matsuda, T. (2000). Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *F. microbiol*, 17, 315–320.

Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosc. Biotech. Biochem*, 60(3), 543-545.

Tabela 1. Planejamento fatorial para estudo da termorresistencia de *A. acidoterrestris* CRA 7152

Ensaio	Variáveis	
	^a T	^b Ni (IU/ml)
1	92	0
2	92	50
3	92	75
4	92	100
5	95	0
6	95	50
7	95	75
8	95	100
9	98	0
10	98	50
11	98	75
12	98	100
13	102	0
14	102	50
15	102	75
16	102	100

^aT (temperatura °C); ^bNi (Nisina IU/ml)

Tabela 2. Porcentagem de redução do valor D a 95°C a diferentes concentrações de nisina em suco concentrado de laranja.

Valor D (min)	intervalo de confiança (\pm)	nisina (IU/ml)	redução (%)
12,86	1,7	0	
12,34	1,5	30	4,04%
11,38	1,6	50	11,50%
10,49	2,5	75	18,41%
9,49	2	100	26,22%
9,42	1,5	150	26,73%

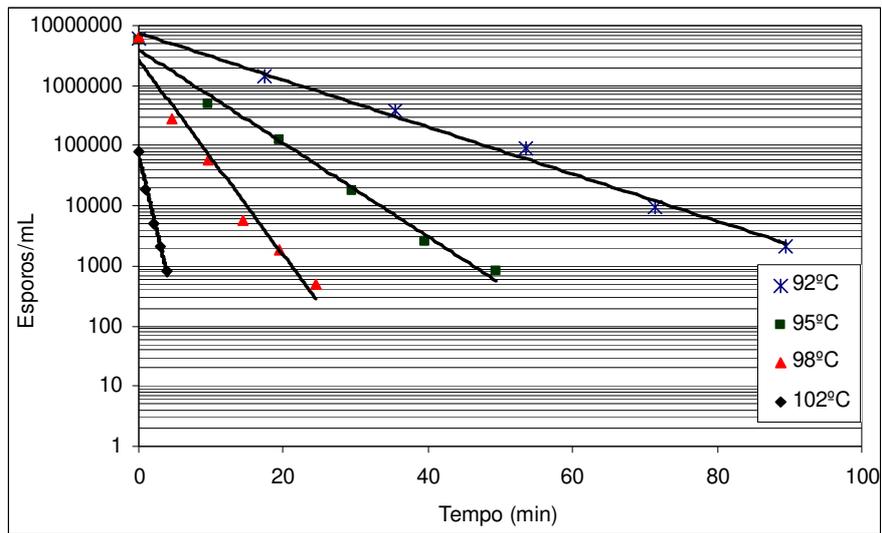
Tabela 3. Efeito da temperatura de aquecimento e da adição de nisina na porcentagem de reduções do valor D de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix.

Nisina (UI/ml)	92°C		95°C		98°C		102°C	
	D (min)	redução						
0	25,56		12,86		6,16		2,01	
50	22,90	10%	11,38	12%	5,55	10%	1,83	9%
75	20,10	21%	10,49	18%	5,12	17%	1,64	18%
100	18,06	29%	9,49	26%	4,76	23%	1,59	21%

Tabela 4. Coeficientes de regressão significativos para o modelo quadrático de inativação de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja.

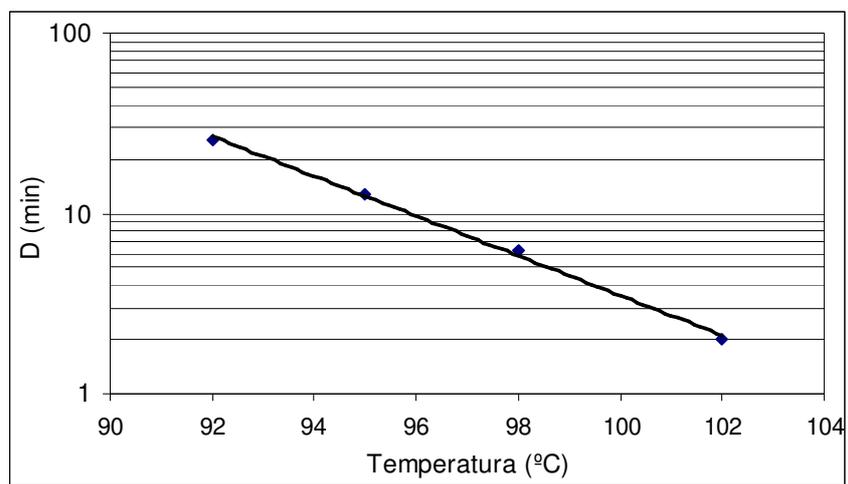
Variáveis	Coeficientes	probabilidade (0,05)
média	2081,5333	< 0,0001
T	-40,3924	< 0,0001
nisina	-0,6982	0,0001
Txnisina	0,00688	0,0002
T ²	0,1961	< 0,0001

Figura 1. Curva de sobreviventes para *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja 64°Brix e pH 3,68, com coeficiente de correlação R^2 : 0,9934; 0,9909; 0,9668 e 0,9879 para 92, 95, 98 e 102°C respectivamente.



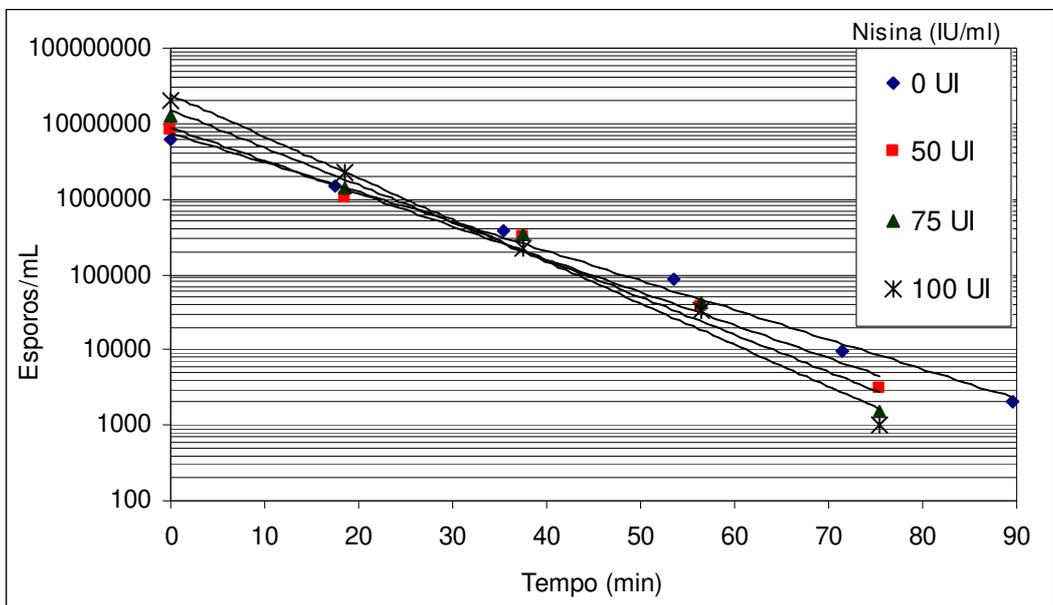
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 2. Valor z para *A. acidoterrestris* CRA7152 em suco concentrado de laranja, pH 3,68 e 64°Brix, com coeficiente de correlação $R^2=0,9977$.



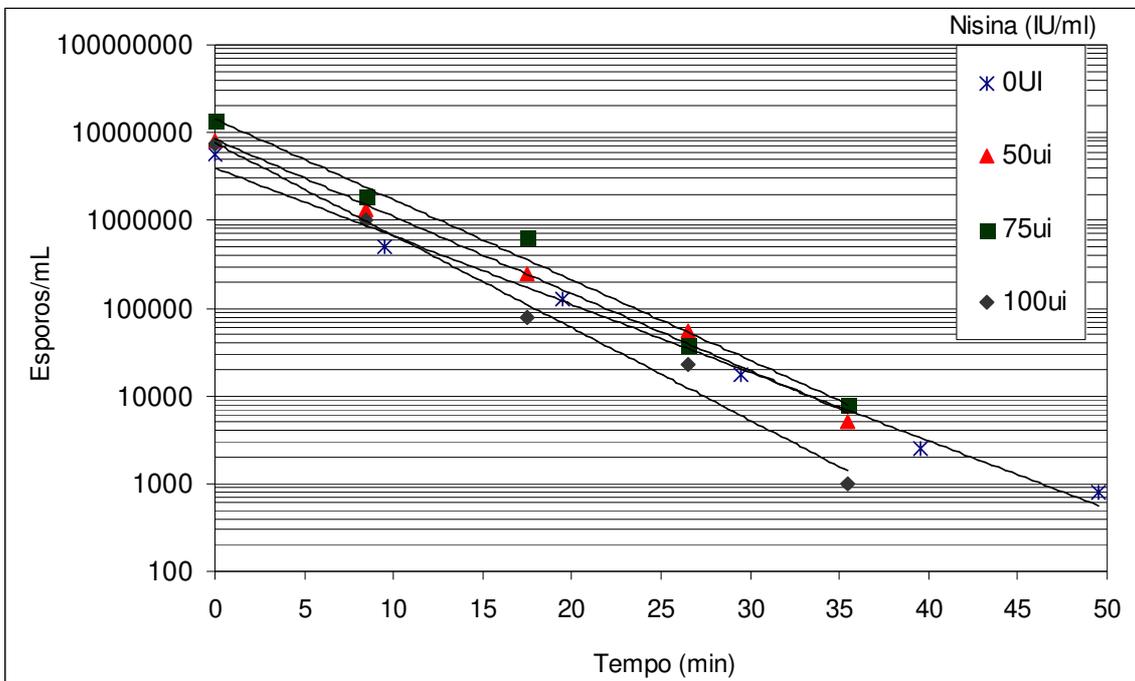
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 3. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de *A. acidoterrestris* CRA 7152 a 92°C em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix. com coeficiente de correlação R^2 de 0,9934, 0,9872, 0,9701 e 0,9892 para 0, 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.



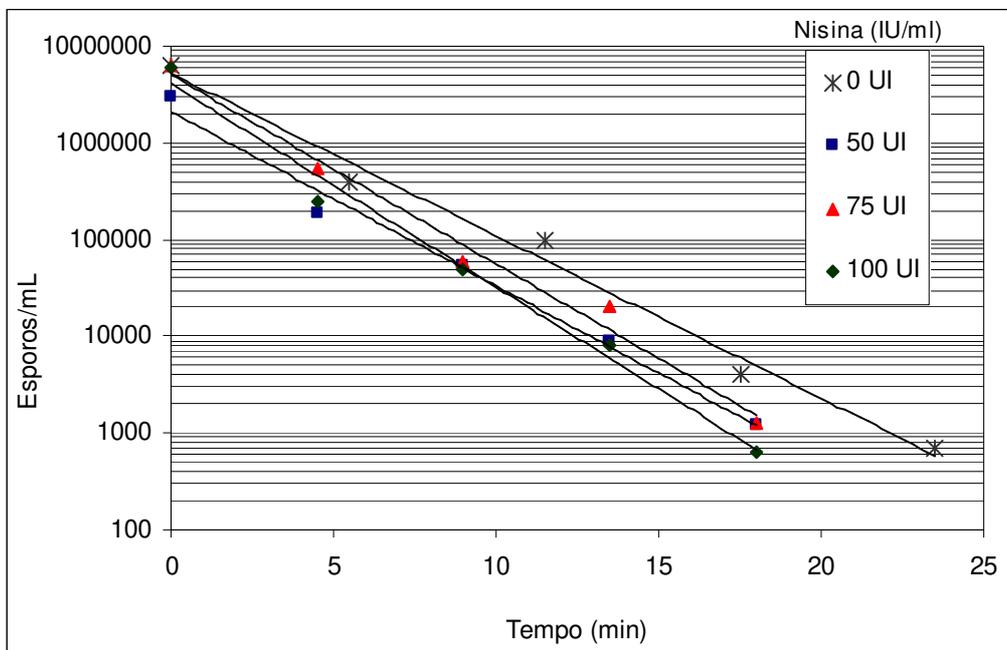
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 4. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de *A. acidoterrestris* CRA 7152 a 95°C pH 3,68 e 64°Brix com coeficiente de correlação R^2 de 0,9909, 0,9943, 0,9849 e 0,9873 para 0, 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.



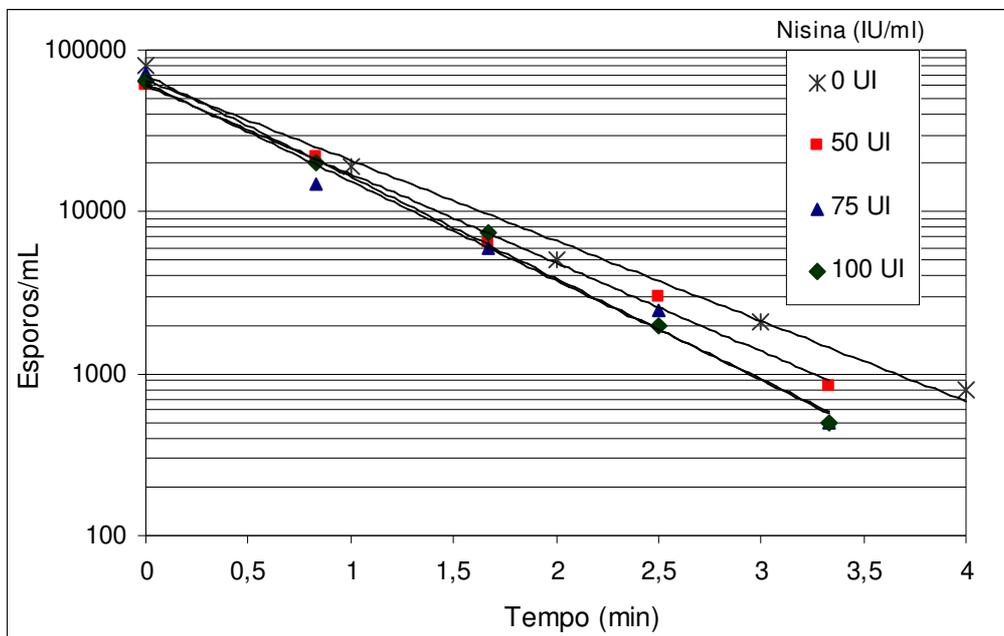
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 5. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de *A. acidoterrestris* CRA 7152 a 98°C pH 3,68 e 64°Brix. Com coeficiente de correlação R^2 de 0,9668, 0,9866, 0,9865 e 0,9868 para 0, 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.



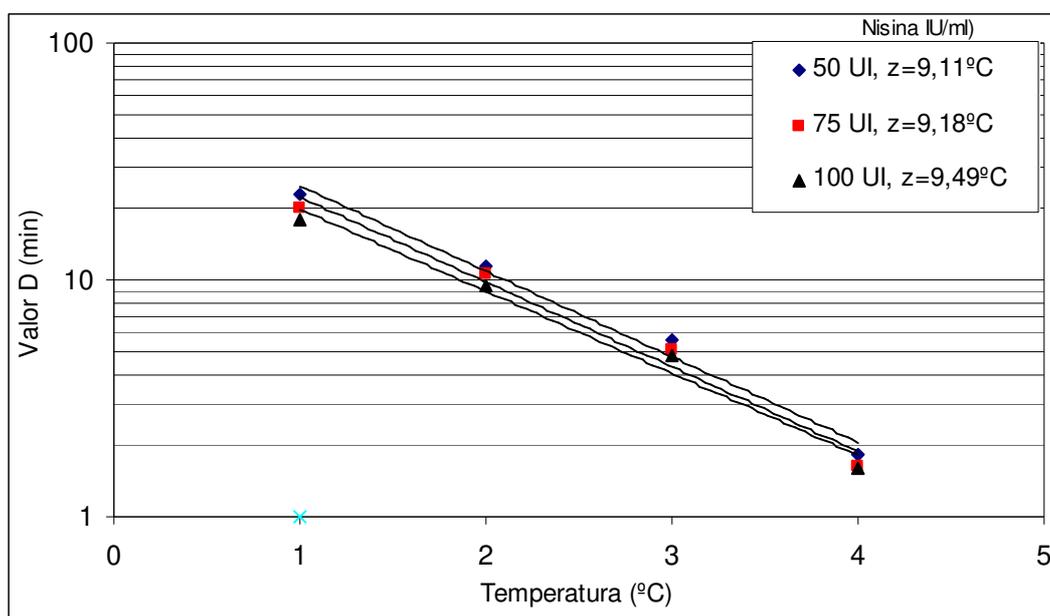
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 6. Efeito da nisina na sobrevivência de esporos de *A. acidoterrestris* CRA 7152 a 102°C pH 3,68 e 64°Brix. Com coeficiente de correlação R^2 de 0,9960, 0,9860, 0,9960 e 0,9879 para 100, 75, 50 e 0IU/ml de nisina respectivamente.



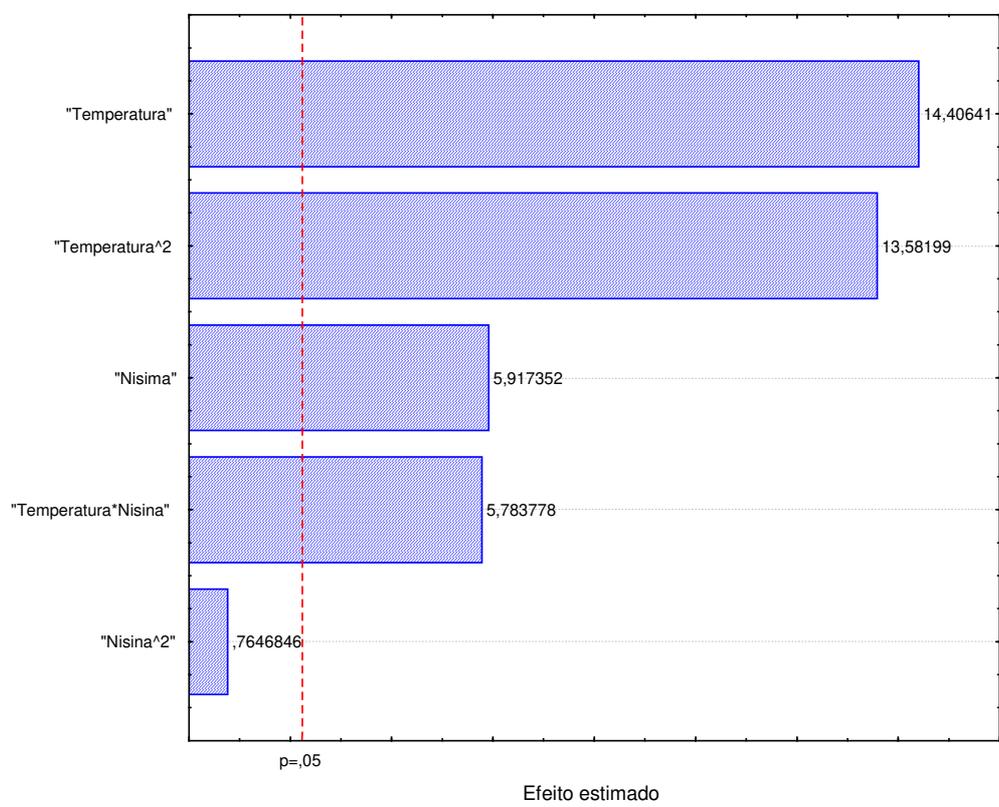
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 7. Efeito da nisina no valor z do *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix. R² de 0,9979, 0,9957 e 0,9964 para 50, 75 e 100IU/ml de nisina respectivamente.



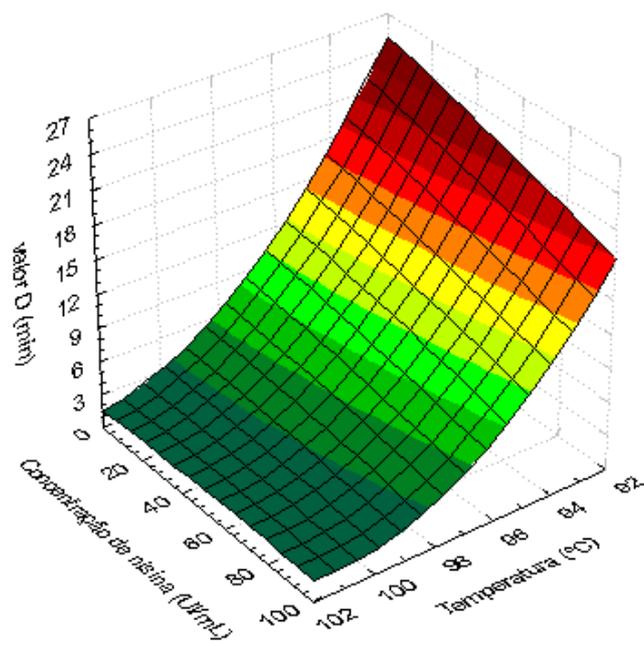
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 8. Gráfico de Pareto para avaliar o efeito dos parâmetros no valor D do *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix.



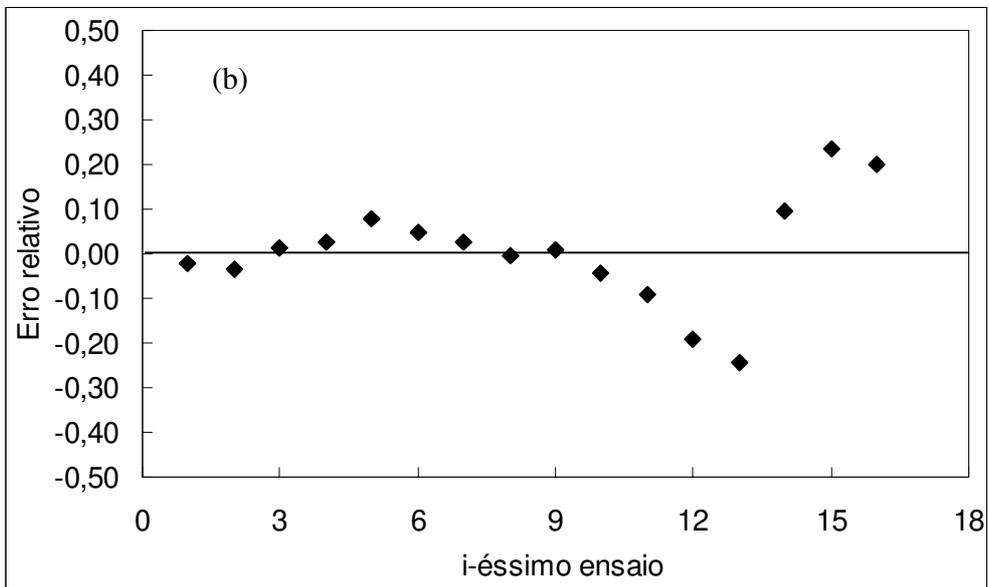
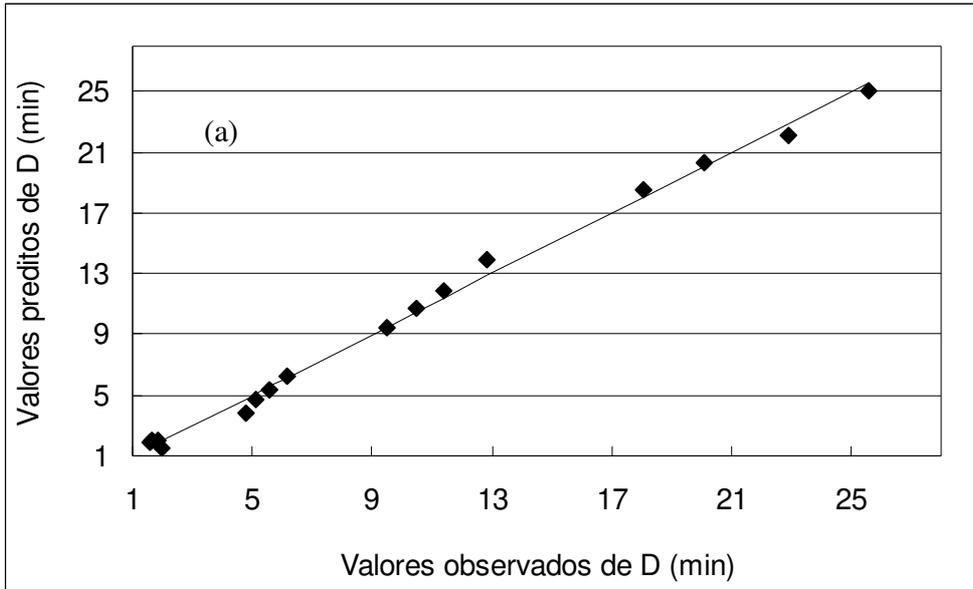
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 9. Efeito da temperatura e concentração de nisina no valor D de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco concentrado de laranja pH 3,68 e 64°Brix.



Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Figura 10. (a) Valores observados vs valores preditos do valor D e (b) erro relativo nas predições do modelo.



Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodriguez de Massaguer

Capítulo 5

**Modelagem do limite de crescimento de
Alicyclobacillus acidoterrestris CRA7152 em suco de
maçã: efeito do pH, Brix, temperatura e concentração de
nisina**

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista
“International Journal of Food Science and Technology”**

Modelagem do limite de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de maçã: efeito do pH, Brix, temperatura e concentração de nisina

Wilmer Edgard Luera Peña¹ & Pilar Rodriguez de Massaguer²

*Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos
CP 6121, CEP 13083-862
Campinas, SP - Brazil*

Modelagem de *A. acidoterrestris* em suco de maçã

Palavras chaves: Suco de maçã, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, nisina, modelagem.

²Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food Engineering, Department of Food Science, Cidade Universitaria, CP 6121, CEP: 13083-862. Fax: 19: 32894966, Campinas, São Paulo, Brazil, E-mail address: ¹edgardwil@hotmail.com, ²esteril@unicamp.br

Resumo

O modelo de regressão logística foi aplicado para descrever o efeito da temperatura (25 a 50°C), pH (3,5 a 5,5), concentração de sólidos solúveis (11 a 19) e concentração de nisina (0 a 70IU/ml) na probabilidade de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã. A concordância do modelo obtido foi de 97,3% indicando um bom ajuste dos dados observados. Os resultados mostraram que com pH 3,7 as probabilidades de crescimento foram pequenas ($<10^{-5}$) para concentrações de nisina acima de 50IU/ml. Com o aumento do pH para 4,5 é preciso aumentar a concentração de nisina para 60IU/ml de forma a manter esses níveis de probabilidades. Com 0,05 de probabilidade de crescimento, valores mínimos de pH foram estabelecidos entre 3,8 e 4,6 para inibir o crescimento com ação sinérgica de nisina em concentração de 0 e 20IU/ml, respectivamente, quando o suco é incubado a 30°C. Os resultados deste estudo, indicaram que o modelo desenvolvido prediz satisfatoriamente a interface de crescimento/não crescimento do *A. acidoterrestris* em suco de maçã e pode fornecer dados que sirvam no controle de qualidade e desenvolvimento de processos.

Introdução

Em 1982, na Alemanha reportou-se em suco de maçã empacotada assepticamente, contaminação por uma bactéria formadora de esporos (Cerny *et al.*, 1984). Doze anos depois Splisttoesser *et al.* (1994) isolaram de suco de frutas pasteurizadas, microrganismos com características similares ao reportado por Cerny *et al.* (1984) altamente resistente ao processo de pasteurização, identificada como *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Desde então, vários foram os estudos realizados para isolamento e caracterização e, poucos objetivando a eliminação e inibição desta bactéria em sucos de frutas ácidas. Visto que a ocorrência foi em meios ácidos, com crescimento em amplas faixas de pH 2,5-6,0 (Yamazaki *et al.*, 1996), 2,5 – 5,5 (Walls e Chuyate, 1998) e ótimo entre 3,5 – 5,0 (Pinhatii *et al.*, 1997). Este microrganismo tornou-se novo indicador de qualidade em sucos de frutas pasteurizados. Em suco de maçã a contaminação por esta bactéria já foi relatada por Borlinghaus e Engel (1997).

A tecnologia de barreira pode ser aplicada para estudar o efeito de vários fatores na inibição deste microrganismo. Fatores nos quais incluem-se conservantes como a nisina, podem ser usados para este propósito (Komitopoulou *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000).

Avaliar as respostas dos microrganismos frente a fatores do meio pode ser dificultoso quando mais de uma variável é estudada. Modelos preditivos podem auxiliar no desenho microbiológico de qualidade e segurança nos alimentos (Buchanan, 1993). Neste contexto, modelos probabilísticos conseguem descrever a probabilidade de um evento ocorrer, dependente ou independente do tempo

(Elliott, 1996) e estabelecer limites críticos das variáveis envolvidas. Modelos probabilísticos baseados em regressão logística podem levar-nos a descrever a interface cresce / não cresce explorando as condições do meio na resposta microbiana (Ratkowsky e Ross, 1995; Lopez-Malo *et al.*, 2000). A regressão logística é uma poderosa ferramenta em modelagem microbiana probabilística. Com suficiente conhecimento das características do produto e condições de estocagem, a probabilidade de crescimento do microrganismo pode ser predita. O modelo de regressão logística tem sido usado para descrever a probabilidade de crescimento de *E. coli* em função de temperatura, pH e atividade de água (Salter *et al.*, 2000; Presser *et al.*, 1998); probabilidade de crescimento e produção de toxina por *Clostridium botulinum* em filé de peixe estocado em atmosfera modificada (Ikawa e Genigeorgis, 1987) e também na determinação da probabilidade de crescimento dependente do tempo de incubação (vida-de-prateleira) (Lopez-Malo e Palou, 2000; Peña *et al.*, 2004).

Os objetivos desta pesquisa foram: i) avaliar as respostas de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maçã com diferentes valores de pH, concentrações de sólidos solúveis e nisina, submetido a diferentes temperaturas de incubação, ii) modelar a interface de crescimento / não crescimento usando modelo de regressão logística polinomial e iii) predizer valores críticos de pH, temperatura e concentração de nisina requeridos para inibir o crescimento da bactéria.

Materiais e métodos

Cepa bacteriana e meios de cultura.

Usou-se a cepa *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 gentilmente cedida pela Danisco Cultor.

Meio de esporulação: *Alicyclobacillus acidocaldarius* médium (AAM) (Murakami *et al.*, 1998): 0,05 % de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 1,5 % de agar; 1,0g de Extrato de levedura; 0,2g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,25g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,60g de KH_2PO_4 1,0g de glicose; 1,0l de água. O pH foi ajustado para 4,0 (Murakami *et al.*, 1998).

Meio de quantificação K: Peptona 5g; Glicose 1g; Extrato de levedura 2,5g; Tween-80 1g; Agar 15g; Água destilada 1,0l. O meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. O pH foi ajustado para 3,7 com ácido málico 25% esterilizado por filtração (Walls e Chuyate, 1998).

Preparação da suspensão de esporos.

Inicialmente foi realizada pré-esporulação de células de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em 4 tubos inclinados contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar - Oxoid), seguido de incubação a 44°C por 3 dias (Pontius *et al.*, 1998). Posteriormente o crescimento nos tubos foi recolhido através de raspagem com baguetas estéreis de vidro utilizando 5ml de água destilada estéril por tubo. A suspensão obtida foi transferida para um tubo de rosca de vidro de 25x200 mm estéril e ativada a 80°C por 10 minutos, seguido de resfriamento rápido em banho de gelo. Inoculou-se 0,1 ml da suspensão ativada em 100 garrafas de vidro de 290 ml contendo 60,0 ml de meio (AAM) solidificado e inclinado. As 100 garrafas

inoculadas foram então incubadas por 9 dias a 45,0°C. Após observação microscópica de 90% do campo esporulado via coloração de esporos utilizando corante verde malaquita, foi realizada a coleta dos esporos (Murakami *et al.*, 1998). Os esporos coletados foram lavados, e re-suspendidos em água destilada estéril após 3 centrifugações (12310g/15 min a 4°C), seguido de lavagens alternadas, com adição de lisozima 0,3 mg/ml de suspensão após a primeira lavagem e ajuste de pH até 11,0 para eliminação das células vegetativas (Stumbo, 1965). Os esporos foram estocados a 4°C em água destilada estéril. A contagem foi feita em meio K após ativação térmica por 10 minutos a 80°C com plaqueamento em profundidade. As placas foram invertidas e incubadas a 43°C por 5 dias. A concentração da suspensão de esporos foi de 8×10^8 esporos/ml.

Determinação da máxima concentração de nisina a ser utilizada no experimento.

Realizou-se um teste para determinar a concentração máxima de nisina em IU/ml para ser usada no experimento. Para tanto foram testados 500, 250, 100, 80, 70, 50, 10, 5 e 0 IU nisina/ml de suco, com pH 4, 11,5⁰Brix e temperatura de incubação de 43⁰C que representaram as condições ótimas de crescimento da bactéria, por um período de 10 dias, seguindo o procedimento de Komitopoulou *et al.* (1999). O plaqueamento em meio K formulado pH 3,7 foi usado para verificar o efeito inibitório da bacteriocina sobre a bactéria. O tamanho do inóculo foi da ordem de 2×10^5 esporos/ml de suco, ativados a 80⁰C por 10min.

Planejamento experimental

Uma vez determinada a máxima concentração de nisina a ser utilizada no experimento, foi estudado o efeito de quatro fatores: pH (3,5, 4,0, 5,0 e 5,5) levando-se em conta pH mínimo do suco e pH mais alto de crescimento da bactéria; temperatura (25, 35, 43 e 50°C), considerando-se a temperatura mínima de crescimento até 5°C acima da faixa ótima; concentração de nisina (0, 30, 50 e 70) levando-se em conta o resultado do teste da concentração máxima de nisina a ser empregada e, sólidos solúveis-Brix (11, 13, 15 e 19) selecionado considerando como limite inferior o Brix do suco simples (11 Brix) e como limite superior 19 Brix, conforme indicado por Splittstoesser et al. (1994), já que acima deste valor o *A. acidoterrestris* não se desenvolve. O procedimento Proc-Factex e Proc-Optex do SAS (Manual SAS/QC “user guide”) foi usado para implementar um planejamento fracionário consistente de 37 ensaios (Tabela 1) a serem testados experimentalmente em duplicata. O pH do suco de maçã foi ajustado com NaOH 5N e ácido málico 25% (p/v) medidos usando um potenciômetro (DMPH-2 Digimed). As diferentes concentrações de sólidos solúveis-Brix foram ajustados com diferentes diluições de água destilada estéril adicionadas no suco concentrado de maçã e medido utilizando refratômetro ATAGO HSRO500. Antes da inoculação todas as amostras foram tratadas termicamente a 105°C por 10min, para eliminar presença de possíveis competidores (Massaguer et al., 2002). A Nisina™ foi cedida pela Danisco Cultor e usada após o preparo de uma solução estoque contendo 10⁴ IU/ml em HCl 0,02N e esterilizada a 121°C por 15 minutos (Scott e Taylor, 1981). A carga inicial inoculada foi da ordem de 3,5x10² esporos/ml de suco de maçã, ativados a 80°C por 10min. A verificação dos efeitos dos fatores

foi realizada depois de 8 e 16 dias de incubação (uma e duas vezes o tempo de incubação estabelecido pela determinação da máxima concentração de nisina empregada nas condições ótimas de crescimento da bactéria), via plaquemento em meio K formulado pH 3,7 seguido de incubação a 43°C por 5 dias.

Avaliação do crescimento e não crescimento

Classificaram-se os ensaios de positivo para crescimento quando o número de contagem de células nas placas foi maior que o número de esporos ativados inoculados no tempo zero ($>3,5 \times 10^2$ UFC/ml), caso contrário foram classificados como negativos. Este critério também foi usado por Lopez-Malo e Palou (2000). Assim, as respostas de crescimento/não-crescimento foram analisadas via modelagem probabilística.

Modelo Probabilístico de Regressão logística

As respostas de crescimento/não crescimento obtidos nos diferentes ensaios da Tabela 1 foram ajustados usando o modelo de regressão logística que descreveu a probabilidade de crescimento da bactéria condicionado a combinação dos vários fatores estudados. O modelo de regressão logística descreveu então a probabilidade do *A. acoditoterrestris* crescer ou não crescer, condicionado a um vetor X de fatores. A equação 1 mostra o modelo específico de regressão logística (Hosmer e Lemeshow, 2000)

$$P(x) = \frac{\exp[\sum \beta_{ixi}]}{1 + \exp[\sum \beta_{ixi}]} \quad (1)$$

Onde p(x) é a probabilidade de crescimento

A transformação logit de p(x) é definida como:

$$\text{Logit}(P) = g(x) = \text{Ln} \left[\frac{p(x)}{1 - p(x)} \right] = \sum \beta_{ixi} \quad (2)$$

Nesta pesquisa, °Brix, pH, concentração de nisina e temperatura de incubação foram as variáveis independentes, sendo a variável dependente a probabilidade do *Alicyclobacillus acidoterrestris* crescer no suco. Essa resposta foi qualificada como “1” para crescimento e “0” para não-crescimento sob as condições avaliadas. Assim o seguinte modelo logito p(x), foi escolhido:

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 pH + \beta_2 Ni + \beta_3 T + \beta_5 Brix + \beta_6 pH.Ni + \beta_7 pH.T + \beta_8 pH.Brix + \beta_9 Ni.T + \beta_{10} Ni.Brix + \beta_{11} T.Brix \quad (3)$$

Onde os $\beta_0, \dots, \beta_{11}$ são os coeficientes do modelo que foram estimados pelo ajuste dos dados experimentais com probabilidade de 0,95, Ni =concentração de nisina em IU/ml, T = temperatura em °C e °Brix = concentração de sólidos solúveis. Para tanto utilizou-se o procedimento de regressão logística do programa SPSS 8.0.

Uma vez ajustado o modelo de regressão logística, predições críticas das variáveis na região de interface de crescimento /não crescimento foram realizadas a um nível de probabilidade de 0,05 pela substituição do valor de logit (p(x)) no modelo da equação 1, e calculado o valor de uma variável independente

mantendo as outras variáveis independentes fixas. Também foram calculadas probabilidades de crescimento usando a equação logística 1 para suco de maçã.

Resultados e discussão

Determinação da maior concentração de nisina a ser utilizada

Observa-se pela Figura 1 que houve crescimento para o controle (0), sem adição de nisina e também para suco adicionado de 5 e 10 IU/ml manifestada pelo ligeiro aumento da população inicialmente inoculada até o sexto dia de incubação. Para 100, 80, 70 e 50IU/ml, observou-se um estado de latência da bactéria, pois não conseguiu crescer, mas também não houve uma redução significativa da população inicial. Concentrações de 250 e 500IU/ml conseguiram inibir o crescimento em no máximo dois ciclos logarítmicos. Observa-se porém, em todos os casos, a diminuição do efeito deste conservante após o oitavo dia de incubação, corroborada pelas contagens das colônias no décimo dia. Komitopoulou *et al.* (1999) determinaram que com 100IU de nisina/ml em suco de maçã foi suficiente para inibir o crescimento do *A. acidoterrestris* por 5 dias de incubação a 45°C. Num outro estudo de sobrevivência de *A. acidoterrestris* em suco de maçã clarificado, Yamazaki *et al.* (2000) encontraram que 600IU/ml foi inibitório apenas por 3 dias de incubação a 40°C e após esse período ocorreu crescimento. As diferenças de resultados entre os valores obtidos no presente estudo com valores de literatura deve-se ao tipo de cepa de microrganismo e a fatores que afetam diretamente a atividade da bacteriocina tais como pH do suco, temperatura, tempo de incubação e ainda o tipo de suco, que no presente estudo

foi suco de maçã polposo e não clarificado como o utilizado por Yamazaki et al (2000). Dado que com 70 IU/ml de suco conseguiu-se inibir o crescimento do *A. acidoterrestris* em até um ciclo log, (Figura 1) na suas condições ótimas de desenvolvimento, é possível empregar até essa concentração de bacteriocina (70IU/ml) em combinação com pH, temperatura e Brix para inibir o crescimento da bactéria, sem necessidade de exceder na dose deste conservante.

Figura 1

Crescimento de *A. acidoterrestris* CRA7152 em suco de maçã.

Das 74 combinações (37x2 replicatas) de temperatura, pH, Brix e concentração de nisina testadas no presente estudo, o crescimento foi observado em 26 tratamentos. Nos demais tratamentos, não houve aumento da população inicialmente inoculada.

Observa-se pela Tabela 1, que com uma maior concentração de sólidos solúveis (19°Brix) e qualquer condição de pH, temperatura e nisina, o crescimento da bactéria foi inibido. Nesta condição existe diminuição da viabilidade da bactéria como consequência da baixa atividade de água. Splisttoesser *et al.* (1994) mostraram inibição do crescimento desta bactéria quando o Brix excedeu os 18,5° sendo também corroborado por Peña e Massaguer (2004). Para 0IU de nisina e $Brix \leq 15$ houve inibição do crescimento apenas para pH, 3,5. Isto significa que este tipo de produto com $pH \leq 3,5$ poderá se manter estável microbiologicamente em pelo menos 16 dias de incubação nas condições testadas. Em vários casos observaram-se crescimento para o maior tempo de incubação (16 dias) e não para o menor tempo (8 dias) evidenciando o efeito combinado dos fatores no tempo de lag. A redução da contagem inicial inoculada nos casos de não crescimento foi

observada durante o período de incubação (dados não mostrados). Isto é importante ressaltar, pois embora não houve aumento da população inicialmente inoculada em 48 casos, a viabilidade do *A. acidoterrestris* foi detectada, indicando a habilidade deste microrganismo de sobreviver nas condições ensaiadas. Evidencia-se também, a não atividade bactericida da nisina e sim bacteriostática como descrito por Komitopulou *et al.* (1999) e Yamazaki *et al.* (2000). Portanto, desde que exista uma quantidade mínima de nisina no suco, este não irá ser deteriorado em determinadas condições de estocagem.

Combinações sinérgicas (Tabela 1) também permitiram inibir o crescimento do microrganismo em condições muito favoráveis de sólidos solúveis e temperatura. Isto é importante, pois poderá ser encontrada uma combinação mínima dos fatores que inibam o crescimento desta bactéria. Assim, dependendo do nível dos fatores de preservação avaliados, os sobreviventes serão capazes de multiplicação aumentando exponencialmente o número inicial ou simplesmente sobrevivendo e se mantendo na contagem inicial. Pinhatii *et al.* (1997) detectaram em suco de laranja contagens de viáveis de até 10^2 esporos/ml. Por outro lado Eguchi *et al.* (2001) mostraram que mesmo populações iniciais baixas no nível de 10^1 - 10^2 células/ml pode ocorrer germinação e crescimento da bactéria em condições favoráveis, tornando o suco susceptível a deterioração por este microrganismo.

Como observado na Tabela 1, o tempo de incubação afetou a atividade da bacteriocina dependendo das condições de temperatura de estocagem. Este fato também já foi mostrado por Delves-Broughton (1990). Assim, prolongar o tempo de incubação significaria obter maior número de casos de crescimento positivo. A

alternativa seria utilizar maiores concentrações de nisina para garantir a inibição da bactéria. Desta forma é importante atentar-se ao tempo de exposição do produto a temperaturas de abuso.

Tabela 1

Modelagem probabilística

O ajuste da equação 3 aos dados da Tabela 1 (16 dias) com eliminação dos termos não significativos ($p > 0,05$) resultou no modelo da equação 4 para descrever a probabilidade de crescimento ($p(\text{cresc})$) da bactéria como resposta à influência dos fatores pH, temperatura, concentração de nisina e sólidos solúveis. A Tabela 2 mostra o valor e a significância de cada coeficiente do modelo. Todos os efeitos principais e as interações do Brix com cada uma das outras variáveis foram significativas.

$$P(\text{cresc}) = \frac{\exp(-26063 + 429825 * pH - 1,9023 * Ni + 3,1839 * T + 13,4063 * Brix - 2,2139 * Brix * pH + 0,1002 * Brix * Ni - 0,1688 * Brix * T)}{(1 + \exp(-26063 + 429825 * pH - 1,9023 * Ni + 3,1839 * T + 13,4063 * Brix - 2,2139 * Brix * pH + 0,1002 * Brix * Ni - 0,1688 * Brix * T))} \quad (4)$$

Tabela 2

A porcentagem correta de concordância foi usada como indicativa de bom ajuste do modelo (Hosmer-Lemeshow, 2000). As determinações de concordância mostraram que 97,3% dos dados foram concordantes com o modelo e apenas 2,7% discordante (Tabela 3). Em outros estudos este valor de concordância foi menor (Bolton e Frank, 1999; Lopez- Malo e Palou, 2000).

Tabela 3

Modelos probabilísticos usando regressão logística tem sido reportados por vários autores para *Shigella flexneri* (Ratkowsky e Ross, 1995); *Saccharomyces cerevisiae* (Lopez-Malo *et al.*, 2000), mostrando flexibilidade na construção do modelo logístico, podendo introduzir dentro do modelo, equações cinéticas tipo raiz quadrada (Ratkowsky e Ross, 1995; Lanciotti *et al.*, 2001) ou modelos tipo polinomial (Konstantinos *et al.*, 2004; Peña, *et al.*, 2004). A presente pesquisa foi a primeira em utilizar esta ferramenta de modelagem com *A. acidoterrestris*.

Através de uma análise da Tabela 2, observa-se que todas as variáveis isoladamente e as interações Brix*T, Brix*pH e Brix*Nisina afetaram a resposta. Assim, usou-se o modelo encontrado (equação 4) para prever probabilidades de crescimento de *A. acidoterrestris* (valores entre 0 e 1) para sucos simples de maçã em dois valores de pH 3,7 e 4,5 a diferentes temperaturas e concentrações de nisina. A pH 3,7, as probabilidades de crescimento foram bem pequenas ($<10^{-5}$) para concentrações de nisina acima de 50IU/ml. Adicionando-se apenas 30IU/ml, podem ser obtidas mínimas probabilidades de crescimento ($<2.10^{-4}$) e suportar temperaturas de abuso de até 45°C. Deve-se enfatizar que estes resultados aplicam-se apenas para estas condições com no máximo 16 dias de estocagem.

Aumentando o pH para 4,5, as probabilidades de crescimento aumentam (Tabela 4) sendo necessário 60IU/ml para obter probabilidades de 2×10^{-5} para qualquer condição de temperatura testada. Nestas condições, 30IU/ml não seria suficiente para manter probabilidades próximas de zero a temperaturas acima de 40°C. É importante indicar que em faixas de temperatura ambiente 25 a 35°C; 10 a 20IU/ml e 30 a 40IU/ml seriam suficientes para manter probabilidades de crescimento próximas de zero ($<10^{-5}$) em sucos simples com pH de 3,7 e 4,5

respectivamente. Similares tabelas de probabilidades podem ser montadas para outros valores de sólidos solúveis e outros valores de pH, sempre que estejam dentro do intervalo da faixa estudada dos fatores.

Tabela 4

As Figuras 2 e 3 mostram as superfícies de algumas condições testadas, sendo observando claramente o efeito e a interação das variáveis em estudo sobre a probabilidade de crescimento do *A. acidoterrestris* em suco de maçã.

A pH 4,5 e 0 nisina (Figura 2b) houve inibição da bactéria apenas em altas concentrações de sólidos solúveis. Com a redução do pH para 3,7 (Figura 2a) aumentou gradualmente o número de combinações brix-temperatura que inibiram o crescimento bacteriano com probabilidades de 0,95, verificando-se não crescimento em qualquer condição de Brix até 30°C. Acima deste valor de temperatura a probabilidade de crescimento fica próxima de zero apenas para sucos próximos de 18°Brix, evidenciando a influência da atividade de água reduzida. Isto é corroborado também pela Figura 2b, mesmo com aumento do pH para 4,5.

Figura 2

A Figura 3 mostra a probabilidade de crescimento como função de Brix-nisina a pH 4,0. Observa-se que mesmo em condições ótimas de temperatura (45°C) (Cerny et al., 2000) é possível obter probabilidades de crescimento próximas de zero adicionando apenas entre 40 e 70IU de nisina/ml. Pela Figura 3a observa-se que mesmo sem nisina o modelo prediz crescimento a 18°Brix com $p=0,4$, sendo que experimentalmente isto não foi observado. Isto é importante, pois mesmo que

com baixa probabilidade de crescimento o modelo estaria predizendo do lado seguro.

Figura 3

As Tabelas 5, 6 e 7 mostram os valores críticos (valores a partir dos quais pode ocorrer inibição ou não do crescimento microbiano) preditos pelo modelo da equação 4 para os diferentes fatores estudados em suco de maçã com 11°Brix.

Assim, pela Tabela 5 observa-se que a 30°C os valores de pH mínimos para ocorrer crescimento a 0,05 de probabilidade seriam de 3,8 (0IU/ml) e 4,6 (20IU/ml). Esses valores críticos de pH diminuem a medida que a temperatura aumenta. Sabe-se que a atividade da nisina se vê afetada quando expostas a valores de temperatura acima de 20°C durante a incubação (Delves Broughton, 1990). Temperaturas entre 40 e 45 são mais favoráveis para o crescimento de *A acidoterrestres* do que 25 a 30°C (Walls e Chuyate, 2000; Eguchi *et al.*, 2001) sendo necessário, portanto, de uma redução do pH para garantir a inibição da bactéria. À medida que a concentração de nisina aumenta, o pH mínimo também aumenta. Assim, valores mínimos ao redor de 4,5 podem ser obtidos com 5, 20, 25, 30 e 40IU/ml para temperaturas de incubação de 25, 30, 35, 40 e 45°C, respectivamente, por um período de incubação de duas semanas.

Tabela 5

No caso das temperaturas críticas (valor de temperatura a partir da qual poderá ocorrer crescimento) com $p= 0,05$ (Tabela 6) observa-se que pode ser obtida ampla faixa de tolerância à medida que a concentração de nisina aumenta. Sucos com pH entre 3,7 e 4,5 podem tolerar abuso de temperatura de 37,1 e 25,9; 43,2 e

31,9; 49,2 e 38,0 quando adicionados 10, 20, e 30 IU/ml de nisina no suco respectivamente.

Tabela 6

A Tabela 7 mostra os valores críticos necessários de concentração de nisina (concentrações mínimas para inibir o crescimento da bactéria) com 0,95 de probabilidade. Observa-se que estes valores mínimos podem ser obtidos dependendo da temperatura utilizada e do pH utilizado. Assim, a 35°C serão necessários 1,8, 13,4 e 22,8 IU/ml de suco a pH de 3,5, 4,0 e 4,5 respectivamente para evitar o crescimento microbiano. Embora se tenha registrado que para inibir em até dois ciclos logarítmicos seja necessário 250IU/ml, quantidades muito menores poderão ser aplicadas em combinações com os outros fatores para causar certo grau de inibição do *A. acidoterrestris* em suco de maçã.

Outros valores de pH, T, e concentração de nisina podem ser calculados para diferentes valores das variáveis estudadas usando a equação 4. Estas análises devem ser levadas em consideração no armazenamento e transporte quando há indícios de presença de *Alicyclobacillus*. Porém, é importante indicar que estas predições são válidas apenas para suco de maçã nas condições avaliadas, no período de tempo estudado. Contudo, fica estabelecido que podem ser empregadas como alternativa para evitar deterioração do suco de maçã pelo desenvolvimento desta bactéria.

Tabela 7

O modelo probabilístico é um das mais importantes ferramentas no controle de processo e até mesmo no desenvolvimento de sistemas APPCC, dado que a determinação dos riscos pode estar em termos de probabilidade. Estes modelos

podem beneficiar a indústria de alimentos, pois descrevem condições que podem ser aplicadas em controle de processo para minimizar o risco de crescimento de um patogênico ou deteriorante. Conhecendo os limites da interface de crescimento / não crescimento é possível estudar o mecanismo fisiológico para qualquer lado da interface. Desta maneira os resultados mostrados nesta pesquisa são de grande importância como alternativa no controle da deterioração de suco de maçã por esta bactéria.

Conclusões

O presente estudo mostrou que o uso da nisina tem um importante papel no controle da contaminação de suco de maçã por *A. acidoterrestris*. Nas condições ótimas de crescimento da bactéria, 500IU/ml foram necessários para reduzir em até 2 ciclos logarítmicos a população, enquanto que com 70 e 80 IU/ml, apenas um ciclo foi reduzido. Entretanto, quantidades muito menores poderão ser usadas em combinação com pH, concentração de sólidos solúveis e temperatura e, conseguir inibir o desenvolvimento deste microrganismo.

A regressão logística mostrou ser uma importante técnica que possibilitou avaliar o desempenho da nisina quando combinado com outros fatores de preservação, podendo ser calculados valores críticos (interface) e prever as probabilidades em diferentes níveis das variáveis. Assim, com probabilidade de 0,05 de crescimento, concentrações de nisina de 1,8 e 18,4IU/ml serão necessárias se os valores de temperatura de abuso de incubação fossem 35 e 45°C, respectivamente, em suco de maçã (11°Brix e pH 3,5). Elevando-se o pH para 4,0; 13,4 e 30IU/ml seriam

necessários para inibir o crescimento da bactéria a 35 e 45°C de incubação, respectivamente. Desta maneira, microbiologia preditiva como técnica para formulação de produto baseado em qualidade e segurança do mesmo pode encontrar nos modelos probabilísticos uma importante ferramenta.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp pelo apoio financeiro. Ao Prof. José F. Carvalho, pelo auxílio na implementação do Proc-Factex/Proc-Optex, À indústria Tecnovin do Brasil Ltda. pelo fornecimento das amostras de suco concentrado de maçã. A Danisco Cultor do Brasil pelo fornecimento da nisina.

Referências bibliográficas

Bolton, L.F. & Frank, J.F. (1999). Defining the growth /no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican style chesse based on salt, pH, and moisture content. Journal Food Protection, v.62, n.6, Pp.601-609.

Borlinghaus, A. & Engel, R. (1997). Alicyclobacillus Incidence in Commercial Apple Juice Concentrate (AJC) supplies-Method development and validation- Fruit Processing, n.7, Pp.262-266.

Buchanan, R.L. (1993). Predictive food microbiology, Trends food science Technol, 4, Pp.6-11.

- Cerny, G., Duong, H.A., Wennlich, W., Miller, S., 2000. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. Food Australia, 52(7), 289-291.
- Cerny, G., Hennlich, W. & Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and characterization of the spoiling microorganism. Z. Lebens. Unters. Forsch, 179, Pp.224-227.
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol. 44(11): Pp100-117.
- Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., Pinhatti, E., Azuma, E. & Variane, S.E. (2001). Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice. Detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. Part.III. Fruit Processing, 2, Pp.95-101.
- Elliott, P.H. (1996). Predictive microbiology and HACCP, Journal of Food Protection, Pp.48-53.
- Hosmer, D.W. & Leweshow, S. (2000). Applied logistic regression, Pp.375 second edition, New York., USA: John Wiley & Sons, INC.
- Ikawa, J.Y.; Genigeorgis, C. (1987). Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish fillets stored under modified atmospheres. International Journal of Food Microbiology, 4, Pp.167-181.
- Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. J. Food Sci. and Technol. 34, Pp. 81 – 85.

Konstantinos, P.K., Kendall, P.A., & Sofos, J.N. (2004). Modeling the boundaries of growth of *Salmonella typhimurium* in Broth as a function of temperature, water activity, and pH. *Journal of Food Protection*, v.67, n.1, Pp.53-59.

Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L. & Guerzoni, M.E. (2001). Growth/no growth interface of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food microbiology*, 18, Pp.659-668,

Lopez-Malo, A. & Palou, E. (2000). Modeling the growth/no-growth interface of *Zigosaccharomyces bailli* in mango puree. *Journal of food science* v.65, n.3, Pp.516-520.

Lopez-Malo, A., Guerrero, S. & Alzamora, S.M. (2000). Probabilistic modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inhibition under the effects of water activity, pH, a potassium sorbate concentration. *Journal of food protection* vol.63 n.1, Pp.91-95,.

Massaguer, P.R., Pacheco, P.C., Atarassi, M.M., Peña, W.L., Gonçalves, A.C., Paula, N.A., Geraldini, L.H., Liossi, L.L., Gagliazzi, M.R., Guerra, V.A. (2002). Sensibility and Specificity of Methods for *Alicyclobacillus* Detection and Quantification: A collaborative study. *Fruit Processing*, 11, Pp.478-482.

Murakami, M., Tedzuka, H. & Yamazaki, K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH, *Food Microbiology*, 15, Pp.577-582.

Peña, L.W.E.; Massaguer, P.R. Response surface modeling for lag-time prediction of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice: effects the pH, Brix, temperature and nisin concentration, Congreso Internacional de Ciencia y tecnología de Alimentos. Córdoba/Argentina, 24 a 26 de Noviembre de 2004. CD-ROM.

Peña, W.L., Faria, J.A. & Massaguer, P.R. (2004). Development of a predictive model on the growth of the spoilage mould, *Paecilomyces variotii*, in pineapple juice. *Fruit processing*, n.6, Pp.420-426.

Pinhatti, M.E.M.C., Variane, S., Eguichi, S.V. & Manfio, G.P. (1997). Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit processing*, v.9, Pp.350-353.

Pontius, A.J., Rushing, J.E. & Foegeding, P.M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *Journal of food protection*, v.16, n.1, Pp.41-46.

Presser, K.A., Ross, T. & Ratkowsky, D.A. (1998). Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration and water activity. *Applied and Environmental microbiology*, 5, Pp.1773-1779.

Ratkowsky, D.A. & Ross, T. (1995). Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Letters in Applied Microbiology*, 20, Pp.29-33.

Salter, M.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. & McMeekin, T.M. (2000). Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology*, n.61, Pp.159-167.

Scott, V.N. & Taylor, S.L. (1981). Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *C. botulinum* spores. *Journal of food science*, 46, Pp.121-125

Splittstoesser, D.F., Churey, J.J. & Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of food protection*, v.57, n.12, Pp.1080-1083.

Stumbo, C.R. (1965). *Thermobacteriology in food processing*, Pp.236 New york, USA: Academic press.

Walls, I. & Chuyate, R. (1998). *Alicyclobacillus*-Historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy, Food and environmental sanitation*, vol. 18, n.8, Pp.499-503.

Walls, I. & Chuyate, R. (2000). Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia*, v.52, n.7, Pp.286-288.

Yamazaki, K., Murakami, M., Kawi, Y., Inoue, N. & Matsuda, T. (2000). Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food microbiology*, 17, Pp.315 – 320.

Yamazaki, K., Teduka, H. & Shinano, H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosc. Biotech. Biochem*, V.60, n.3, Pp.5+43-545.

Tabela 1. Respostas de crescimento e não crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco maçã.

X1	X2	X3	X4	R*1	R*2	R**1	R**2
5,5	70	50	11	0	0	0	0
5,5	70	43	19	0	0	0	0
5,5	50	43	13	1	1	1	1
5,5	50	35	15	0	1	1	1
5,5	30	35	13	0	0	1	1
5,5	30	25	11	0	0	0	0
5,5	0	50	19	0	0	0	0
5,5	0	25	15	1	1	1	1
3,5	70	43	15	0	0	0	0
3,5	70	35	11	0	0	0	0
3,5	50	50	13	0	0	0	0
3,5	50	35	19	0	0	0	0
3,5	30	50	11	0	0	0	0
3,5	30	43	15	0	0	0	0
3,5	0	25	19	0	0	0	0
5	70	25	15	0	0	0	0
5	70	25	13	0	0	0	0
5	50	50	15	0	0	1	1
5	50	25	19	0	0	0	0
5	30	43	19	0	0	0	0
5	30	43	11	1	1	1	1
5	0	50	13	1	1	1	1
5	0	35	11	1	1	1	1
4	70	50	19	0	0	0	0
4	70	35	13	0	0	0	0
4	50	43	11	0	0	0	0
4	50	25	11	0	0	0	0
4	30	50	15	0	0	1	1
4	30	35	19	0	0	0	0
4	30	25	13	0	0	0	0
4	0	43	15	1	1	1	1
4	0	43	13	1	1	1	1
3,5	0	35	11	0	0	0	0
4	0	35	11	0	1	1	1
5	0	43	11	1	1	1	1
5,5	70	50	19	0	0	0	0
3,5	0	25	11	0	0	0	0

X1=pH, X2=concentração de nisina (IU/ml), X3=temperatura (°C), X4=concentração de sólidos solúveis (Brix), R1 e R2 (respostas amostras 1 e 2: 1-cresce, 0-não cresce), *(8 dias de incubação), **(16 dias de incubação).

Tabela 2. Coeficientes das variáveis significativas para construção do modelo logístico para crescimento de *A. acidoterrestris*.

Variável estimada	coeficiente	p-valor
Constante	-260,63	0,0446
pH	42,9825	0,0497
Nisina	-1,9023	0,046
Temperatura	3,1839	0,0382
Brix	13,4063	0,0492
Brix*pH	-2,2139	0,0524
Brix*Nisina	0,1002	0,0463
Brix*Temp	-0,1688	0,0425

Tabela 3. Classificação dos valores observados e preditos usando modelo logístico para crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã (16 dias).

resposta observada	resposta predita		
	não crescimento	crescimento	%
	0	(1)	correto
não crescimento (0)	48	0	100
crescimento (1)	2	24	92,31
Global			97,3

Tabela 4. Probabilidades de crescimento ($p=0,05$) de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã 11°Brix.

pH=3,7		Concentração de nisina (IU/ml)					
Temperatura (°C)	0	10	20	30	40	50	60
25	0,00002	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
30	0,01191	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
35	0,90179	0,00307	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
40	0,99986	0,70095	0,00078	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
45	1,00000	0,99944	0,37433	0,00020	0,00000	0,00000	0,00000
50	1,00000	1,00000	0,99781	0,13248	0,00005	0,00000	0,00000
pH=4,5		Concentração de nisina (IU/ml)					
Temperatura (°C)	0	10	20	30	40	50	60
25	0,97916	0,01550	0,00001	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
30	0,99997	0,92305	0,00400	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
35	1,00000	0,99989	0,75380	0,00103	0,00000	0,00000	0,00000
40	1,00000	1,00000	0,99957	0,43869	0,00026	0,00000	0,00000
45	1,00000	1,00000	1,00000	0,99832	0,16631	0,00007	0,00000
50	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,99346	0,04845	0,00002

Tabela 5. pH crítico predito com $p=0,05$ do *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã

Ni (IU/ml)	Temperatura (°C)				
	25	30	35	40	45
0	4,1	3,8	-	-	-
5	4,4	4,0	3,6	-	-
10	4,6	4,2	3,9	3,5	-
20	5,0	4,6	4,3	3,9	3,6
25	5,2	4,9	4,5	4,1	3,8
30	5,4	5,1	4,7	4,4	4,0
40	-	5,5	5,1	4,8	4,4
50	-	-	-	5,2	4,9

Tabela 6. Temperatura critica predita com $p=0,05$ do *A. acidoterrestris* em suco de maçã

pH	Nisina (IU/ml)					
	0	10	20	30	40	50
3,5	33,9	39,9	46,0	52,0	-	-
3,7	31,1	37,1	43,2	49,2	55,2	-
4	26,9	32,9	39,0	45,0	51,0	-
4,5	-	25,9	31,9	38,0	44,0	50,0
5	-	-	24,9	30,9	37,0	43,0

Tabela 7. Concentração de nisina crítica para crescimento de *A. acidoterrestris*

CRA 7152 a p=0,05 em suco de maçã

pH	Temperatura (°C)				
	25	30	35	40	45
3,5	-	-	1,8	10,1	18,4
3,7	-	-	6,5	14,7	23,0
4	-	5,1	13,4	21,7	30,0
4,5	8,5	14,5	22,8	31,0	39,3
5	20,1	28,4	36,7	45,0	53,3

Figura 1. Efeito inibitório da nisina sobre o *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã 11⁰Brix, pH 4 e 43⁰C.

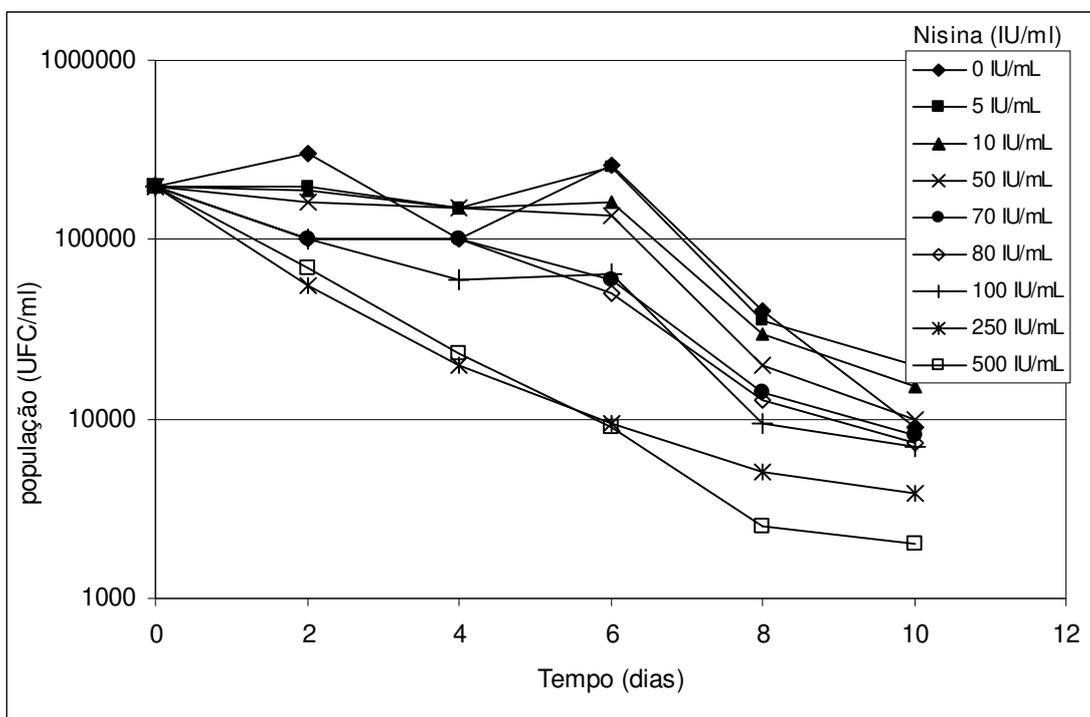


Figura 2. Probabilidade de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã: Brix vs Temperatura; Nisina 0IU/mL, (a) pH=3,7, (b) pH=4,5.

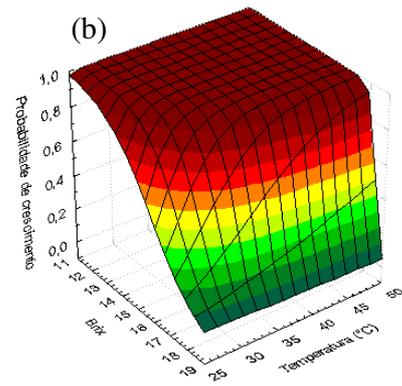
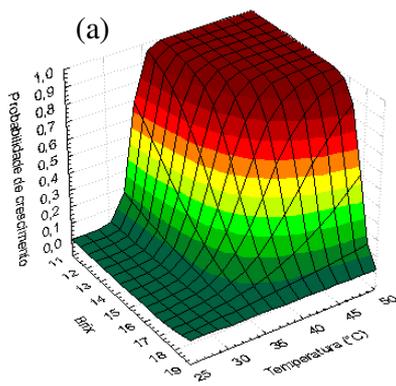
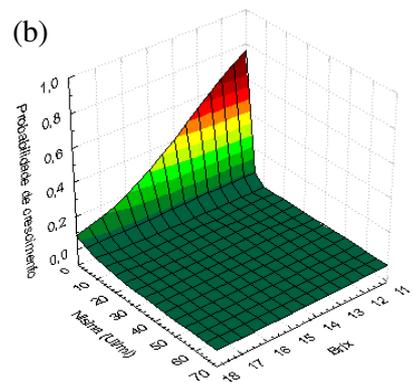
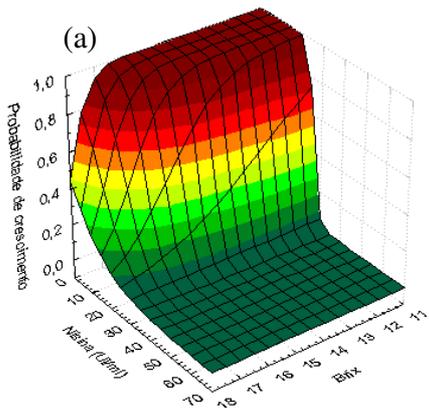


Figura 3. Probabilidade de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã: Brix vs Concentração de nisina:pH=4,0: (a) 45°C, (b) 30°C.



Capítulo 6

Uso de redes neurais artificiais na modelagem da sobrevivência do *Alicyclobacillus acidoterrestris*

CRA7152 em suco de maçã

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista “Food Science and Technology International”

Uso de redes neurais artificiais na modelagem da sobrevivência do *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de maçã

Wilmer Edgard Luera Peña¹ and Pilar Rodriguez de Massaguer²

*Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos
CP 6121, CEP 13083-862
Campinas, SP - Brazil*

²Corresponding author: State University of Campinas, Faculty of Food Engineering, Department of Food Science, Cidade Universitaria, CP 6121, CEP: 13083-862. Fax: 19-32894966, Campinas, São Paulo, Brazil, E-mail address:

¹edgardwil@hotmail.com, ²esteril@unicamp.br

RESUMO

Redes neurais artificiais (RNA) foram propostas como técnica alternativa de aplicação no campo de microbiologia preditiva. O estudo foi baseado na determinação da viabilidade e crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã sobre os efeitos do pH (3,5 a 5,5), temperatura (25 a 50°C), concentração de nisina (0 a 70IU/ml) e sólidos solúveis-Brix (11 a 19). Um polinômio quadrático foi desenvolvido e utilizado como modelo comparativo frente ao modelo neural. Os resultados experimentais mostraram que 70IU de nisina/ml foram suficientes para inibir o crescimento do *A. acidoterrestris* em qualquer condição testada e resultados similares podem ser obtidos com concentrações menores deste conservante em ação sinérgica com o pH, temperatura e Brix. Uma rede artificial com 4 nodos na camada de entrada (representando os fatores estudados), 4 nodos na camada escondida e 1 nodo na camada de saída (representando o crescimento ou perda de viabilidade) foi a que melhor se ajustou ao processo estudado. Os resultados mostraram que ambos os modelos conseguiram explicar os dados experimentais. Os valores dos índices estatísticos para validação dos modelos: Porcentagem média residual relativa (MRPR) e Resíduo relativo médio absoluto (MARR) foram respectivamente -17,43 e 17,81 para o modelo polinomial e, de -1,67 e 14,54 para o modelo neural, mostrando que a performance do RNA foi levemente superior ao modelo polinomial; podendo esta técnica ser explorada no campo da modelagem microbiana.

Palavras chaves: Redes neurais artificiais, modelo quadrático, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, suco de maçã, modelagem.

INTRODUÇÃO

A presença de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de frutas pode ser incidental e não necessariamente indicar deterioração do produto (Eguchi et al., 2001). A deterioração causada por este microrganismo é de difícil detecção em embalagem fechada, pois o suco aparenta estar normal ou mostrar ligeira sedimentação; a contaminação é evidenciada quando apresenta “off-flavor” descrito como medicinal e antisséptico (Walls e Chuyate, 1998). Os responsáveis químicos desse “off-flavor” foram descritos como guaiacol e/ou componentes fenólicos e, podem ser detectados em sucos de frutas em quantidades de até 2ppb (Pettipher et al., 1997). Desde que existam esporos sobreviventes, mesmo em baixos níveis como 10^1 ou 10^2 esporos/ml, estes podem germinar, crescer e causar deterioração do produto uma vez que existam as condições adequadas para seu desenvolvimento (Eguchi et al., 2001).

Cerny et al (1984) e Komitopoulou et al. (1999) relataram incidência deste microrganismo em suco de maçã, mostrando que este produto é susceptível a deterioração por esta bactéria.

Microbiologia preditiva é uma importante área emergente com significativa aplicação na indústria de processamento de alimentos (Buchanan *et al*, 1989; Davey, 1989). O uso de modelos de superfície de resposta 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. Vários autores realizaram estudos utilizando redes neurais artificiais (Garcia-Gimeno, et al., 2002; Geeraerd et al., 1998 e Hajmeer et al., 1997) na

modelagem dos parâmetros de crescimento microbiano. Baugmam e Liu (1995) ressaltaram a eficiência desta técnica quando comparada com modelos empíricos tradicionais.

Lou e Nakai (2001) propuseram o uso de RNA no estudo do efeito da temperatura, pH e atividade de água na inativação térmica de *E. coli* e *Listeria monocytogenes*. Os autores mostraram a superioridade desta técnica nas predições quando comparada com o modelo quadrático de superfície de resposta e com o modelo de Cerf et al. (1996).

O aumento da utilização de redes neurais segundo Basheer e Hajmeer (2000) em microbiologia preditiva, é o resultado de algumas características desta técnica tais como: i) habilidade de reconhecer e aprender as relações entre as variáveis independentes e dependentes pouco compreendidas e sem explicação física considerável e ii) alta tolerância com dados contendo ruídos (variabilidade). Porém algumas limitações foram apontadas pelos autores: i) o sucesso de RNA depende da boa qualidade dos dados e ii) falta de habilidade para explicar o processo através do qual gera as decisões - respostas (RNA é criticado por ser uma caixa preta). Contudo seus benefícios podem ser explorados por ser uma poderosa ferramenta para modelar sistemas onde exista alta relação entre os parâmetros em estudo, podendo sua estrutura ser aplicada em modelagem microbiana.

O objetivo desta pesquisa foi estudar o uso de redes neurais artificiais na modelagem da inibição e crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã comparando-o estatisticamente com o modelo polinomial quadrático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepa bacteriana e meios de cultura.

A cepa *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 gentilmente cedida pela Danisco Cultor foi utilizada nesta pesquisa.

Meio de esporulação: *Alicyclobacillus acidocaldarius* médium (AAM) (Murakami *et al.*, 1998): 0,05 % de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 1,5 % de agar; 1,0g de Extrato de levedura; 0,2g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,25g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,60g de KH_2PO_4 1,0g de glicose; 1,0l de água. O pH foi ajustado para 4,0 (Murakami *et al.*, 1998). E esterilizado a 121°C por 15 min.

Meio de quantificação K: Peptona 5g; Glicose 1g; Extrato de levedura 2,5g; Tween-80 1g; Agar 15g; Água destilada 1,0l. O meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. O pH ajustado para 3,7 com ácido málico 25% esterilizado por filtração (Walls e Chuyate, 1998).

Preparação da suspensão de esporos.

Inicialmente foi realizada pré-esporulação de células de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em 4 tubos inclinados contendo meio PDA-Potato-Dextrose-Agar (Oxoid), incubados a 44°C por 3 dias (Pontius *et al.*, 1998). Posteriormente o crescimento nos tubos foi recolhido através de raspagem com baguetas de vidro estériles, utilizando 5ml de água destilada estéril por tubo. A suspensão obtida foi transferida para um tubo de rosca de 25x200 mm estéril sendo ativada a 80°C por 10 minutos; seguido de resfriamento rápido em banho de gelo até temperatura ambiente. Inoculou-se 0,1 ml da suspensão ativada em cada uma de 100 garrafas de vidro de 290 ml contendo 60ml de meio (AAM)

solidificado e inclinado. As 100 garrafas inoculadas foram então incubadas por 9 dias a 45°C. Após observação microscópica de 90% do campo esporulado, via coloração de esporos com verde de malaquita, foi realizada a coleta dos mesmos (Murakami *et al.*, 1998). Os esporos coletados foram lavados e re-suspendidos em água destilada estéril após 3 centrifugações (12310g por 15 min a 4°C), seguido de lavagens alternadas com água estéril e adição de lisozima (0,3 mg/ml de suspensão) após a primeira lavagem com ajuste de pH até 11 para eliminação das células vegetativas (Stumbo, 1965). Os esporos foram estocados a 4°C em água destilada estéril até uso posterior. A contagem da suspensão foi realizada em meio K após ativação térmica por 10 minutos a 80°C, com plaqueamento em profundidade. As placas invertidas foram incubadas a 43°C por 5 dias. A concentração da suspensão de esporos foi de 8×10^8 esporos/ml.

Planejamento experimental

Foi utilizado suco de maçã polposo concentrado (41°Brix) congelado como matéria prima na preparação das amostras experimentais.

A matriz de dados dos efeitos de quatro fatores: pH (3,5 4,0, 5,0 e 5,5); temperatura (25, 35, 43 e 50°C); Brix (11, 13, 15, e 19) e concentração de nisina (0, 30, 50, e 70IU/ml), na sobrevivência do *A. acidoterrestris* em suco de maçã, foi gerada usando o procedimento Proc-Factex e Proc-Optex do SAS v.8.0 (Manual SAS/QC “user guide”) num total de 37 combinações (Tabela 1). Este conjunto de dados foi utilizado para o treinamento da rede. Paralelamente foi implementado um modelo polinomial quadrático para descrever o crescimento ou perda de viabilidade em função dos fatores acima indicados, usando também este mesmo

conjunto de dados. Posteriormente foram testados experimentalmente 8 combinações na faixa de estudo das variáveis (Tabela 3) que foram usadas para testar a validação da rede e do modelo quadrático implementado.

As diferentes combinações de pH foram ajustadas com NaOH 5N e ácido málico 25% p/v, medidos em potenciômetro (DMPH-2 Digimed).

Medida do crescimento

A carga inicial inoculada foi da ordem de $3,5 \times 10^2$ esporos/ml de suco, ativadas a 80°C por 10min em cada uma das combinações em duplicata da Tabela 1. A verificação dos efeitos dos fatores na viabilidade e crescimento da bactéria foi realizada após 16 dias de incubação mediante plaqueamento em profundidade utilizando meio K formulado (pH 3,7) seguido de incubação a 43°C por 5 dias. A resposta foi expressa em $\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_0)$. Sendo N_f a população depois de 16 dias de incubação e N_0 a concentração inicial (Sinigaglia et al., 2003)

Modelagem

Modelo polinomial quadrático

O modelo empírico polinomial de segunda ordem para os quatro fatores (pH, temperatura, Brix e concentração de nisina) foi estabelecido pela equação 1.

$$Y = b_0 + b_1T + b_2T^2 + b_3pH + b_4pH^2 + b_5Ni + b_6Ni^2 + b_7Brix + b_8Brix^2 + b_9T * pH + b_{10}T * Ni + b_{11}T * Brix + b_{12}pH * Brix + b_{13}pH * Ni + b_{14}Brix * Ni + \varepsilon \quad (1)$$

Onde Y é o $\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_0)$ – variável dependente; T=temperatura (°C); Ni=concentração de nisina (IU/ml); e $b_0, b_1 \dots b_{14}$ os coeficientes do modelo.

Estes coeficientes foram estimados por análise de regressão não linear, através do software SAS V.8.0 (Anova, opção modelos polinomiais) para o ajuste estatístico. O modelo encontrado foi validado pelo teste F.

Modelo empírico de redes neurais artificiais (RNA)

RNA foi aplicada para estudar a relação não linear entre as variáveis de entrada (temperatura, pH, Brix e concentração de nisina) e a variável de saída ($\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_o)$). Najjar *et al.* (1997) detalharam o desenvolvimento da topologia de redes neurais artificiais (RNA). Os dados da Tabela 1 foram utilizados para treinamento da rede e os da Tabela 3 para testar a sua validação.

A estrutura de rede neural utilizada foi estabelecida usando o procedimento de “Levenberg-Marquardt”, com Regularização Bayesiana como algoritmo de treinamento (Demuth e Beale, 2002). As funções de ativação utilizadas foram sigmoideal “logsig” na camada oculta e “linear” na camada de saída. Este algoritmo de treinamento e esta combinação de funções de ativação foram estabelecidos como os mais adequados quando comparados com o procedimento de Levenberg-Maquardt puro (LM) e de retropropagação (“Backpropagation”) puro para algoritmos de aprendizagem e “tansig” (tangente hiperbólica) para funções de ativação segundo Pacianotto (2003). Esta regularização é usada para melhorar o teste, evitando o sobre ajuste.

O uso da regularização Bayesiana assume uma função objetivo F, que pode ser descrita pela equação 2.

$$F = \alpha.SSE + \beta.SSW \quad (2)$$

Onde SSE = somatório dos erros quadráticos, SSW somatório do quadrado dos pesos e bias, α e β parâmetros da função objetivo.

Os parâmetros de regularização são obtidos com estrutura Bayesiana usando o algoritmo de “Levenberg-Maquardt” (Foresee e Hagan, 1997) (Matlab v.6.5). Uma das características deste algoritmo é gerar uma medida de quantos parâmetros de rede (pesos e bias) estão realmente sendo usados. Esse número efetivo de parâmetros permanece constante, independente do número total de parâmetros da rede, indicando desta maneira que a melhor configuração de rede foi encontrada (Demuth e Baele, 2002).

Neste estudo a rede foi composta pela camada de entrada contendo 4 neurônios artificiais (T, pH, concentração de nisina e sólidos solúveis-^oBrix), uma camada de saída com um neurônio que correspondeu ao valor de inibição ou crescimento ($\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_o)$) do *A. acidoterrestris*. Os nodos da camada intermediária foram estabelecidos empiricamente analisando o número de parâmetros efetivos através do algoritmo de regularização Bayesiana. Todos os dados de entrada e saída foram normalizados entre 0 e 1 antes de serem utilizados na modelagem e 2000 iterações iniciais foram estabelecidas; porém o programa termina a simulação antes de completar este número de iterações, quando a convergência é atingida.

São vários os tipos de redes existentes. O tipo escolhido para este estudo foi a rede neural alimentação para frente (*feedforward*) multicamada que é muito poderosa em função de otimização da modelagem. Nestas redes os sinais são propagados da camada de entrada para a camada escondida e logo para a camada de saída. O nodo recebe os sinais via conexão com os outros neurônios.

Cada nodo recebe um valor de **entrada** p que é multiplicado por um **peso** w ; deste produto é subtraído o limiar interno "**bias**" b para logo ser analisado pela função de transferência f e gerar uma **saída** a (Baugman e Liu, 1995). A equação 3 representa este critério.

$$a = f\left(\sum_{i=1}^n wp\right) - b \quad (3)$$

O limiar interno **bias** é um parâmetro externo do neurônio artificial que governa a saída do nodo e pode aumentar ou diminuir a entrada na função de ativação; se b é grande e positivo o nodo tem grande limiar interno e pode inibir a ativação do nodo. Por outro lado se b é zero ou negativo, o nodo tem baixo limiar interno que excita a ativação do nodo.

Neste estudo foi utilizada a ferramenta computacional para modelagem "Neural Network Toolbox do Software MATLAB[®]" versão 6.5 (2002). Esta ferramenta compreende um conjunto de funções implementadas para o desenvolvimento de redes neurais. O código da RNA desenvolvido no MATLAB[®] v.6.5 está em anexo(cap.6).

Critério de convergência

Para treinamento e validação do modelo de rede foi adotado o critério de convergência baseado no erro que representou a diferença entre os valores dos dados de saída experimental e os preditos pelo modelo. O critério de convergência foi de 1×10^{-4} .

O método mais comum utilizado em redes neurais é a soma do erro quadrático (SSE) (Baughman e Liu, 1995), que representa o desvio total das saídas preditas com o seu correspondente dado experimental. A equação 4 apresenta esta relação.

$$SSE = \sum (\mu_{obs} - \mu_{pred})^2 \quad (4)$$

Onde μ_{obs} = é o valor da saída observada e μ_{pred} = a saída predita.

Critérios de comparação

Segundo Jeyamkondan et al. (2001), os critérios de comparação de dados preditos por redes neurais e modelos estatísticos contra dados experimentais podem ser definidos através dos seguintes procedimentos:

Análises gráficas: onde os valores preditos são graficados contra os observados. Os pontos em relação à linha de igualdade mostram claramente as regiões de sobre e sub predição. Também a análise de resíduos é um parâmetro importante de distribuição das predições. (Figuras 4 e 5)

Porcentagem média residual relativa (MRPR): onde a diferença do (Observado - Predito) está normalizado em relação ao Observado. Um valor de MRPR nulo indica que não há desvios na predição, um valor positivo indica que o valor predito é maior que o observado, enquanto um valor negativo indica que o valor predito é menor que o observado. Esta situação pode ter caráter positivo ou negativo dependendo do parâmetro em estudo. A equação 5 apresenta o MRPR.

$$MRPR = \frac{1}{n} \sum \frac{O - P}{O} * 100 \quad (5)$$

Onde O=observado, P=predito, n= número de observações.

Resíduo relativo médio absoluto (MARR): este parâmetro descreve o mesmo critério que o fator exatidão descrito por Ross (1996). Se o MARR for 25%, as previsões diferem em média 25% (para cima ou para baixo) dos valores observados. Assim, segue a equação 6.

$$MARR = \frac{1}{N} \sum \left| \frac{O - P}{O} \right| * 100 \quad (6)$$

Onde O=observado, P=predito, N= número de observações.

Raiz quadrada do resíduo médio (RMSR)

$$RMSR = \sqrt{\frac{\sum (O - P)^2}{N}} \quad (7)$$

Onde O=observado, P=predito, N= número de observações.

Fator exatidão: calcula a média da distância entre cada ponto e a linha da equivalência como uma medida de quão próximas, da média, as previsões estão das observações (Ross, 1996), de acordo com a equação 8.

$$fator - exatidão = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log \left(\frac{predito}{observado} \right) \right|}{n} \right)} \quad (8)$$

Onde n é o número de observações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar os efeitos do pH, concentração de nisina, temperatura e concentração de sólidos solúveis-^oBrix apresentados no planejamento da Tabela 1, foi calculada a razão entre o logaritmo da população microbiana presente no suco depois de incubação prolongada de 16 dias e o logaritmo do nível do inóculo

no tempo zero. Valores menores que 1 indicaram que a viabilidade dos esporos inoculados decresceu (houve inibição), enquanto que valores maiores que 1 indicaram crescimento (Tabela 1). Em várias combinações a razão $\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_0)$ foi menor que 1 (pH=4, 50IU/ml, 43°C e 11°Brix; pH=5, 30IU/ml, 43°C e 19°Brix; pH=3,5, 30IU/ml, 43°C e 15°Brix). Nestes ensaios, mesmo o suco estando em condições ótimas de temperatura para crescimento do *Alicyclobacillus*, não houve desenvolvimento microbiano. Tal fato indica que o efeito das barreiras foi eficiente no controle de contaminação por *A. acidoterrestris*. A explicação dessa diminuição da viabilidade é pouco compreendida, porém é possível supor que, como o inóculo foi de esporos ativados, eles iniciaram a germinação, mas seu desenvolvimento foi inibido antes de atingir o crescimento pós-germinativo quando expostas às condições de stress provocadas pelos níveis dos fatores estudados. Isto é importante, pois, embora não tenha sido observado aumento da população inicialmente inoculada em muitos dos casos, a habilidade de crescimento do *A. acidoterrestris* foi detectada indicando sobreviventes em concentrações menores que $3,5 \times 10^2$ UFC/ml. Esse número é relativamente baixo para causar deterioração, mas em condições favoráveis podem crescer e tornar o suco susceptível à deterioração por este microrganismo. Pinhatii *et al.* (1997) detectaram, em suco de laranja, contagens de esporos em níveis de 10^2 esporos/ml. Eguchi *et al.* (2001) mostraram que mesmo populações pequenas de 10^1 a 10^2 UFC/ml podem crescer e contaminar o produto, quando expostas em condições favoráveis de crescimento da bactéria.

Tabela 1

Modelos preditivos

Modelo polinomial quadrático

Os dados de Log(Nf)/Log(No) da Tabela 1, como função dos efeitos principais do pH, °Brix, concentração de nisina, temperatura e suas interações, foram ajustados por regressão ao modelo da equação 1.

A Tabela 2 apresenta o ajuste de todos os coeficientes da equação 1 com nível de probabilidade de 0,05.

Tabela 2

Observa-se que todas as variáveis estudadas foram significativas ($p < 0,05$) no nível linear, com exceção do Brix. No nível quadrático, pH e temperatura resultaram ser significativos. A taxa entre Log(Nf) e Log(No), depois de 16 dias, foi afetada positivamente pelo pH, temperatura e a interação Ni*Brix, e negativamente pela concentração de nisina.

O R^2 do modelo foi de 0,793. O Valor de F calculado de 15,91; maior que o F tabelado de 2,35 indicando alta significância.

A equação 3 descreve o modelo encontrado

$$\frac{\text{Log}(Nf)}{\text{Log}(No)} = -11,2928 + 4,5020 * pH - 0,0332 * Ni + 0,1651 * Temp - 0,020 * pH * Brix + 0,001 * Ni * Brix - 0,4431 * pH^2 + 0,0020 * Temp^2 \quad (9)$$

Onde: Ni=concentração de nisina (IU/ml); Temp=temperatura (°C);

Sinigaglia et al. (2003) estudaram o efeito da temperatura (35 a 50°C), atividade de água (0,96 a 9,992) e pH (3,5 a 5,5) na germinação e crescimento de esporos de *A. acidoterrestris* em meio laboratorial, conseguindo ajustar dois polinômios

com $r^2 = 0,77$ e $r^2 = 0,78$ para 2 e 7 dias de incubação. Na Figura 1 observa-se o efeito da interação entre o pH e a concentração de sólidos solúveis- $^{\circ}$ Brix incubados a 35°C. Observou-se crescimento bacteriano em pHs de 4 a 5 (Figura 1a), enquanto que em faixa extrema de 3,5 e 5,5, 30IU de nisina/ml de suco inibiu o desenvolvimento do microrganismo em sucos com o $^{\circ}$ Brix maior do que 14. Entretanto 70IU de nisina/ml de suco foi suficiente para não permitir o desenvolvimento microbiano em qualquer condição de pH e $^{\circ}$ Brix, mesmo a temperatura de abuso de 35°C (Figura 1b). Observou-se ainda redução da população inicialmente inoculada em valores extremos de pH e $^{\circ}$ Brix.

Figura 1

Modelo neural

Usando o algoritmo desenvolvido no MATLAB[®] v.6.5, foi realizada a análise dos dados para o modelo neural. A Figura 2 apresenta a comparação de quantidades de parâmetros totais da rede, **N** (soma total de pesos e bias) com o número de parâmetros efetivos (γ) a partir da variação da quantidade de neurônios na camada escondida. Desta forma é possível verificar que, para um número baixo de neurônios o valor de **N** e γ apresentaram-se muito próximos. A medida em que o valor do número de neurônios na camada escondida aumentou, a diferença entre **N** e γ também aumentou até que o valor de γ permaneceu constante. Com 4 neurônios na camada escondida encontrou-se o maior número de parâmetros efetivos utilizados pela rede. Um aumento deste número de neurônios significaria maior esforço computacional e incorporação de ruídos no modelo.

Figura 2

Assim a topologia que apresentou maior consistência nos resultados foi 4x4x1 (4 nodos na camada de entrada x 4 nodos na camada escondida x 1 nodo na camada de saída). Com essa topologia e, utilizando a função de ativação “logsig” e “linear” para a camada escondida e de saída respectivamente, a rede foi treinada e validada usando os dados das tabelas 1 e 3 respectivamente. Foram gerados os pesos e bias da camada escondida e de saída (Tabelas 3 e 4) que poderão ser usados na predição de dados $\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_o)$ de *A. acidoterrestris* em suco de maçã, dentro das condições testadas.

Tabela 3

Tabela 4

Os valores de entrada são ponderados aplicando a matriz de pesos, subtraindo deste valor ponderado o limiar interno (valor bias), que serão logo processados através da função de transferência nos neurônios da camada oculta, que depois de processado passa a informação para a camada de saída (Figura 3).

Figura 3

Comparação estatística entre o modelo polinomial de segunda ordem e o modelo neural

Uma primeira comparação foi feita através da Figura 4 onde os dados preditos vs experimentais usados no treinamento da rede e na construção do modelo quadrático são apresentados. A amplitude do resíduo foi levemente maior para o modelo quadrático do que para redes neurais indicando haver maior desvio nas

predições. Porém, os resíduos das predições de ambos os modelos ficaram aleatoriamente distribuídos indicando predições não sistemáticas.

Figura 4

Para melhor comparação entre ambos os modelos foi realizada a validação a partir de um conjunto de combinações dos fatores que não foram usados na construção do modelo quadrático nem no treinamento da rede, mas que estão dentro do universo amostral. Os resultados estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5

Observa-se pela Tabela 5 que ambos os modelos tiveram predições próximas aos dados experimentais. O modelo quadrático da equação 9 prediz crescimento ligeiramente maior do que realmente ocorre. Ou seja, em termos de crescimento microbiano o modelo estaria predizendo do lado seguro, indicando maior contaminação do produto antes que esta aconteça. No caso das predições do modelo neural, 4 predições, ficaram maiores que seu correspondente dado experimental e as outras 4 menores; desta maneira a aleatoriedade nas predições foi verificada. A Figura 5 mostra graficamente a discussão do desempenho de ambos os modelos na validação, constatando o que já foi descrito. Essa diferença na performance dos modelos, nesta etapa, pode estar relacionada à variabilidade biológica envolvida nos dados.

Figura 5

Os resultados dos parâmetros estatísticos estão na Tabela 6. Observa-se uma melhor performance levemente para redes neurais do que para o modelo quadrático, tanto para os dados de treinamento quanto para validação. Resultados similares foram encontrados por Hajmeer et al. (1997) com dados de crescimento

de *Shigella flexneri*. As previsões para os dados de validação podem ser consideradas boas, tanto para redes neurais como para o modelo polinomial, pois elas foram previstas a partir de dados de saída não visto no treinamento nem na construção do modelo quadrático. Segundo Baranyi e Roberts (1995), a menos que o número de pontos sejam bem maior do que o número de parâmetros do modelo de regressão polinomial, não há nenhuma garantia de que as previsões sejam exatas. Modelos gerados com dados completos geram superfícies diferentes dos modelos gerados com dados incompletos (Bratchell et al., 1989). Isto é relevante já que neste estudo foi utilizada uma matriz fracionária. É importante salientar que o desempenho de RNA está baseado especificamente no treinamento e, que o critério de parada da aprendizagem da rede é função de minimizar a soma do erro quadrático entre a saída prevista e a saída experimental que está relacionada com os algoritmos de treinamento utilizados. Assim a importância do uso destes algoritmos é proporcional a natureza dos dados em questão.

Tabela 6

O MRPR e fator bias fornecem resultados para um mesmo critério. No caso de RNA o valor de MRPR indicou 3,44%, em média de sobre ajuste, no treinamento e 1,67% na validação. Já o modelo polinomial apresentou um MRPR similar de 3,26%, de sobre ajuste, na implementação do modelo e de 17,44% na validação. Por outro lado o fator bias indicou que as previsões do modelo polinomial com o treinamento e validação da rede foram muito parecidas (0,4 a 1,8% em média). No caso da validação do modelo polinomial este sobrestimou os valores observados em 16,9% em média. Essa diferença entre o fator bias e o índice MRPR pode

estar associada à diferença nos parâmetros normalizados ou até mesmo às operações matemáticas envolvidas no fator bias (logaritmo e exponencial). Porém, ambos os índices estatísticos indicaram que os modelos predizem, em média, para o lado seguro. Discussão parecida pode ser discorrida no caso do fator exatidão e o índice MARR. Segundo Jeyamkondam et al. (2001) o MRPR e MARR resultam ser índices mais adequados para comparar modelos do que os fatores bias e exatidão.

O índice MARR indicou que modelo RNA foi melhor (13,9 e 14,54% em média de desvios para treinamento e validação) do que o modelo quadrático (18,8 e 17,8% em média dos desvios na implementação e validação do modelo). Já o índice RMSR não apontou maior diferença entre os modelos quando comparado com os mencionados anteriormente sendo muito próximos entre eles. A normalização de dados é essencial em microbiologia preditiva, pois a grande variabilidade de sistemas biológicos afeta as respostas estudadas. Assim, precaução é essencial durante a interpretação destes parâmetros estatísticos para selecionar o melhor modelo.

Como citado anteriormente, dados de crescimento microbiano representam não linearidade e o comportamento bacteriano pode mudar sobre condições diferentes. Assim, enfoque não linear dos dados é necessário para encontrar o modelo representativo do sistema.

Outro ponto importante é a quantidade dos dados de entrada e saída representativos do processo pois, melhores predições poderão ser obtidas com um maior bancos de dados, já que a característica de redes neurais envolve a

compreensão das relações implícitas a partir de conjuntos de dados de entrada e saída (Sablani *et al.*, 1995).

Dos resultados, conclui-se que 70IU de nisina/ml foram suficientes para inibir o crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de maçã frente a qualquer condição de ensaiada. Porém, menores concentrações deste conservante podem ser usadas dependendo do nível do pH, temperatura e concentração de sólidos solúveis presentes.

A rede com 4 neurônios na camada escondida foi a melhor topologia para representar o sistema estudado. O modelo polinomial encontrado foi estatisticamente significativo. As predições realizadas por RNA baseadas nos índices estatísticos MARR, MRPR, MRSR e gráficos foram levemente melhores do que os preditos pelo modelo quadrático polinomial tanto na implementação dos modelos como na validação, sendo que estes índices foram suficientes para comparar a competência dos modelos testados.

Melhores ajustes poderão ser obtidos se maiores números de conjunto de dados entrada-saída forem usados em redes neurais; dado que neste estudo apenas um planejamento fracionário para representar uma combinação de 4 fatores em 4 níveis foi utilizado. Embora neste estudo, a técnica de redes neurais não ter sido muito superior ao modelo polinomial de segunda ordem, mostrou ser uma alternativa em modelagem de predição de sistemas não linear complexa, podendo ser exploradas no campo da microbiologia preditiva.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp pelo apoio financeiro. A Professora Ana Maria Frattini Fileti pelo auxílio na implementação do código neural. A indústria Tecnovin do Brasil Ltda. pelo fornecimento das amostras de suco concentrado de maçã

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baranyi J. and Roberts T.A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26: 199-218.
- Basheer L.A. and Hajmeer M. (2000). Artificial neural network: fundamentals, computing, design, and application. *Journal of Microbiology Methods* 43: 3-31.
- Baughman D. R. and Liu Y. A. (1995). *Neural networks in bioprocessing and chemical engineering*. San Diego, California: Academic Press, 488p.
- Bratchell N., Gibson A.M., Truman M., Kelly T.M. and Roberts T.A. (1989). Predicting microbial growth: the consequence of quantity of data. *International Journal of Food Microbiology* 8: 47-58.
- Buchanan R.L., Stahl H.G. and Whiting R.C. (1989). Effects and inactivation of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection* 52: 844-851.
- Cerf O., Davey K.R. and Sadoudi A.K. (1996). Thermal inactivation of bacteria – a new predictive model for the combined effect of three environmental factors: temperature, pH and water activity. *Food Research International* 29: 219-226.

- Cerny, G., Hennlich, W., Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Z. Lebens. Unters. Forsch.* 179, 224-227.
- Davey K.R. (1989). A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal Applied Bacteriology* 67: 483-488.
- Demuth H., Beale M. (2002). *Neural Network Toolbox User's Guide for use with MATLAB®. Version 4 Reading: Hagan, M. Backpropagation.* pp.5.2-5.49.
- Eguchi S.Y., Manfio G.P., Pinhatti E., Azuma E. and Variane S.E. (2001). Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice. Detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. Part.III. *Fruit Processing* 2: 95-101.
- Foresee F.D. and Hagan M.T. (1997). Gauss-Newton Approximation to Bayesian Learning In: *Proceedings of the International Joint Conference on Neural Networks*, [URL:http://elec-engr.okstate.edu/mhagan/](http://elec-engr.okstate.edu/mhagan/)
- Garcia-Gimeno R.M., Hervas-Martinez C. and Silóniz M.I. (2002). Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. *International Journal Food Microbiology* 72: 19-30.
- Geeraerd A.H., Herreman C.H., Cenens C. and Van Impe J.F. (1998). Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to

describe bacterial growth in chilled food products. *International Journal of Food Microbiology* 44: 49-68.

Hajmeer M.H., Basheer L.A. and Najjar Y.M. (1997). Computational neural networks for predictive microbiology: II. Application to microbial growth. *International Journal of food microbiology* 34: 51-66.

Jeyamkondan S., Jayas D.S. and Holley R.A. (2001). Microbial growth modeling with artificial neural networks. *International Journal of Food Microbiology* 64: 343-354.

Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R., (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *J. Food Sci. and Technol*, 34, 81–85.

Lou W. and Nakai S. (2001). Application of artificial neural networks for predicting the thermal inactivation of bacteria: a combined effect of temperature, pH and water activity. *Food Research International* 34: 573-579.

Murakami M., Tedzuka H. and Yamazaki K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology* 15: 577-582.

Najjar Y.M., Basheer I.A. and Hajmeer M.N. (1997). Computational neural network for predictive microbiology: I. Methodology. *International Journal of Food Microbiology* 34: 27-49.

Pancionotto T.A. (2003). Aplicação de redes neurais para o ajuste operacional do período final de sopro de um processo de aciaria a oxigênio. Tese de Mestrado (Universidade estadual de Campinas), Campinas.

Pettipher G.L., Osmundson M.E. and Murphy J.M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters Applied Microbiology* 24: 185-189.

Pinhatti M.E.M.C., Variane S., Eguichi S.V. and Manfio G.P. (1997). Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit processing* 9: 350-353.

Pontius A.J., Rushing J.E. and Foegeding P.M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *Journal of food protection* 16: 41-46.

Ross T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal Applied Bacteriology* 81: 501-508.

Sablani S.S., Ramaswamy H.S. and Prasher S.O. (1995). A neural network approach for processing applications, *Journal of food processing and preservation* 19: 283-301.

Sinigaglia M., Corbo M.R., Altieri C., Campaniello D., D'amato D. and Bevilacqua A. (2003). Combined effects of temperature, water activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Food Protection* 66: 2216-2221.

Stumbo C.R. (1965). *Thermobacteriology in Food Processing*. New York: Academic press. pp.236

Walls I. and Chuyate R. (1998). Alicyclobacillus-Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation 18: 499-503.

Tabela 1. Crescimento e viabilidade de *A. acidoterretris* CRA 7152 em suco de maçã.

pH	Nisina*	Temperatura	Brix	Log(Nf)/Log(No)**
5,5	70	50	11	0,718
5,5	70	43	19	0,794
5,5	50	43	13	1,195
5,5	50	35	15	1,122
5,5	30	35	13	2,170
5,5	30	25	11	0,952
5,5	0	50	19	0,939
5,5	0	25	15	1,080
3,5	70	43	15	0,523
3,5	70	35	11	0,412
3,5	50	50	13	0,895
3,5	50	35	19	0,924
3,5	30	50	11	0,866
3,5	30	43	15	0,927
3,5	0	25	19	0,976
5	70	25	15	0,830
5	70	25	13	0,649
5	50	50	15	1,312
5	50	25	19	0,909
5	30	43	19	0,968
5	30	43	11	2,189
5	0	50	13	2,380
5	0	35	11	2,318
4	70	50	19	0,719
4	70	35	13	0,821
4	50	43	11	0,843
4	50	25	11	0,849
4	30	50	15	1,110
4	30	35	19	0,968
4	30	25	13	0,756
4	0	43	15	2,249
4	0	43	13	2,315
3,5	0	35	11	0,998
4	0	35	11	2,185
5	0	43	11	2,165
5,5	70	50	19	0,958
3,5	0	25	11	0,987

*(IU/ml), ** (média de duas repetições).

Tabela 2. Coeficientes de regressão significativos do modelo quadrático de sobrevivência de *A. acidoterrestris* CRA 7152.

Variável	Coeficiente	Desvio padrão	probabilidade
Media	-11,2928	2,8453	0,0004
pH	4,5020	1,1877	0,0007
Nisina	-0,0332	0,009	0,0010
Temperatura	0,1651	0,0547	0,0053
pH*Brix	-0,0200	0,0061	0,0029
Nisina*Brix	0,0014	0,0006	0,0304
pH ²	-0,4431	0,1329	0,0024
Temperatura ²	0,0020	0,0007	0,0100

Tabela 3. Matriz de pesos e bias da camada intermediaria

Matriz de pesos camada oculta (w_{ij})				Bias (T_i)
$w_{11}=1,957$	$w_{21}=-0,887$	$w_{31}=-0,081$	$w_{41}=0,425$	$T_1=-1,767$
$w_{12}=1,975$	$w_{22}=-2,961$	$w_{32}=1,294$	$w_{42}=-0,530$	$T_2=-1,804$
$w_{13}=-1,210$	$w_{23}=1,888$	$w_{33}=0,237$	$w_{43}=-1,686$	$T_3=-0,460$
$w_{13}=-0,297$	$w_{24}=-1,794$	$w_{34}=0,042$	$w_{44}=1,306$	$T_4=-0,720$

Tabela 4. Matriz de pesos e bias da camada de saída.

Matriz de pesos camada de saída (v_{1j})				Bias (T_j)
$v_1=-2,820$	$v_2=2,162$	$v_3=-1,844$	$v_4=-1,526$	1,147

Tabela 5. Resultados dos dados de validação.

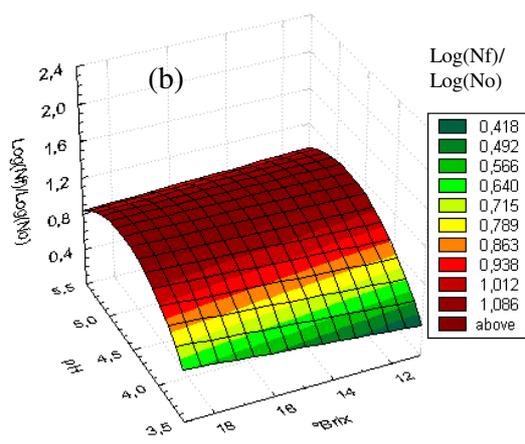
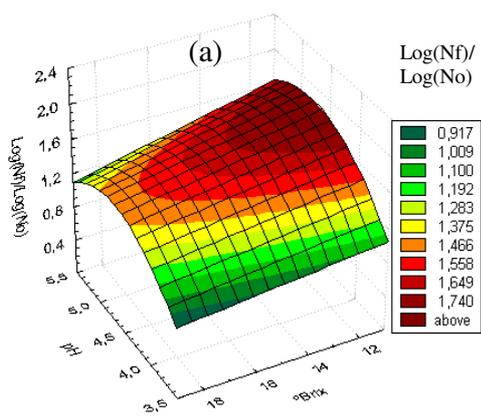
pH	Nisina (IU/ml)	Temperatura	Brix	Log(Nf)/Log(No)		
				Experimental	Predito modelo Polinômial	Predito redes
3,9	10	33	12	1,298	1,680	1,463
4,5	10	33	12	1,511	2,003	1,805
3,9	20	33	14	1,248	1,418	1,415
4,5	20	33	14	1,454	1,718	1,378
3,9	10	40	14	1,499	1,678	1,788
4,5	10	40	14	2,007	1,978	1,483
3,9	20	40	12	1,523	1,644	1,353
4,5	20	40	12	1,545	1,968	1,406

Tabela 6. Comparação estatística de redes neurais como o modelo quadrático.

Parâmetro estatístico	Modelo	Dados	Valor estatístico
Porcentagem residual médio relativo (MRPR) (%)	RNA	treinamento	-3,443
		validação	-1,671
	Polinomial	total	-3,268
		Validação	-17,438
Resíduo relativo médio absoluto (MARR) (%)	RNA	treinamento	13,938
		validação	14,544
	Polinomial	total	18,868
		validação	17,810
Raiz quadrada do resíduo médio (RMSR)	RNA	treinamento	0,175
		validação	0,263
	Polinomial	total	0,264
		validação	0,299
Fator exatidão	RNA	treinamento	1,143
		validação	1,157
	Polinomial	total	1,205
		validação	1,174
Fator bias	RNA	treinamento	1,018
		validação	1,004
	Polinomial	total	1,007
		validação	1,169

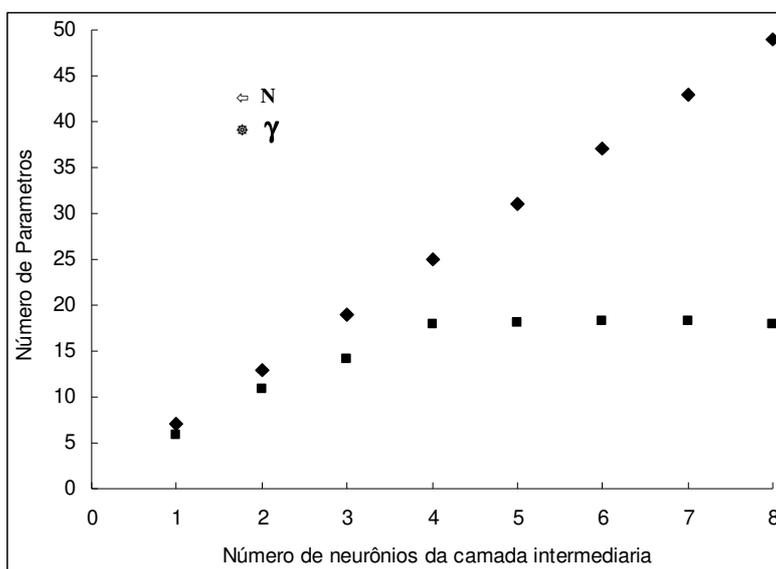
Figura 1. Superfície de resposta no crescimento e inibição de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã incubado a 35°C com adição de nisina de (a) 30IU/ml e (b) 70IU/ml.

Top ↑



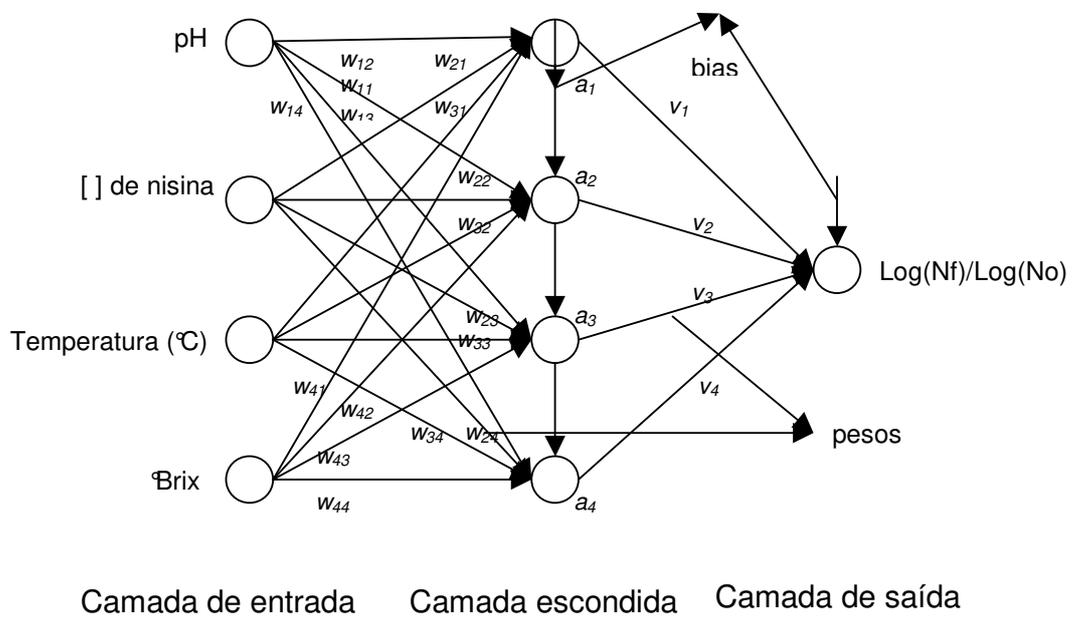
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodrigues de Massaguer

Figura 2. Comparação da quantidade de parâmetros totais da rede com o número de parâmetros efetivos a partir da variação da quantidade de neurônios da camada escondida.



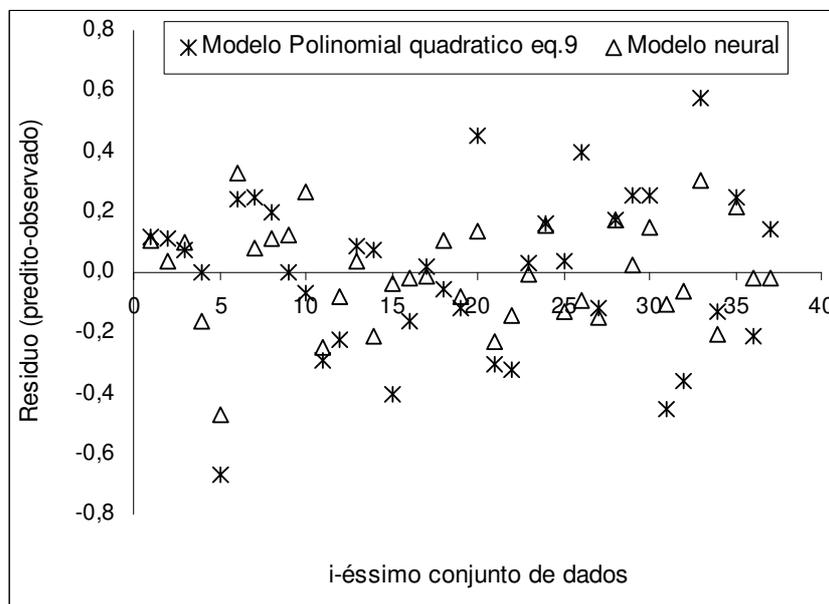
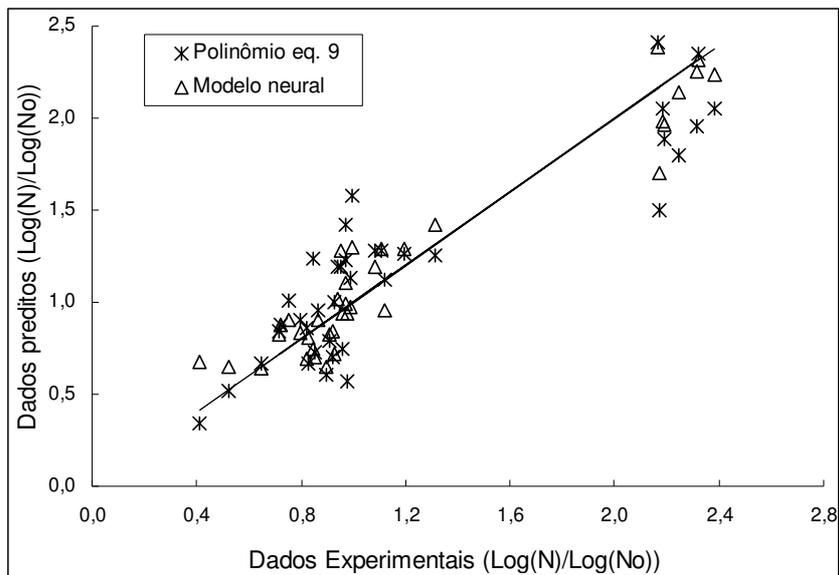
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodrigues de Massaguer

Figura 3. Estrutura neural de previsão do $\text{Log}(N_f)/\text{Log}(N_o)$ de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de maçã. (w_{ij} =pesos para a camada escondida), v_i (pesos para a camada de saída)



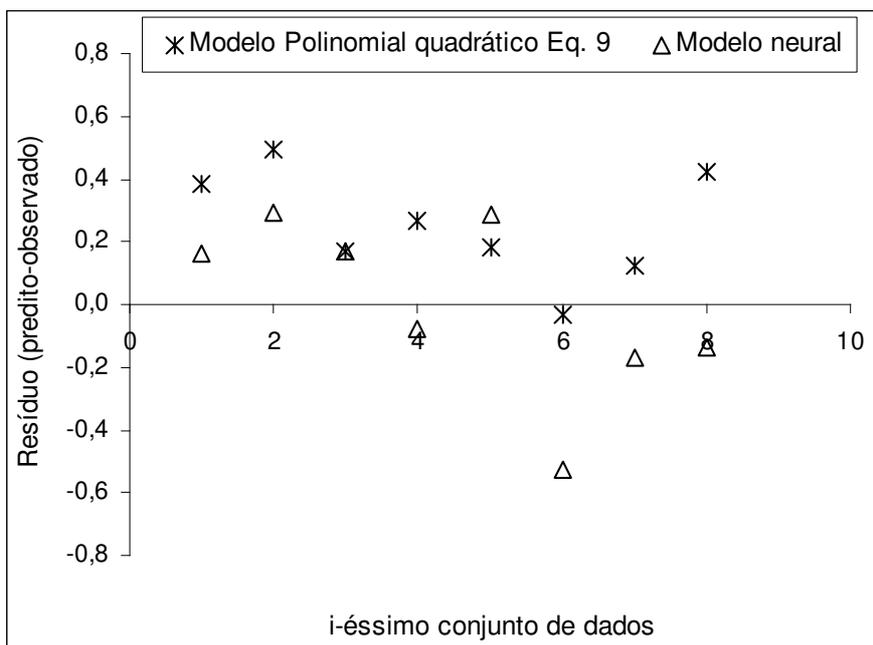
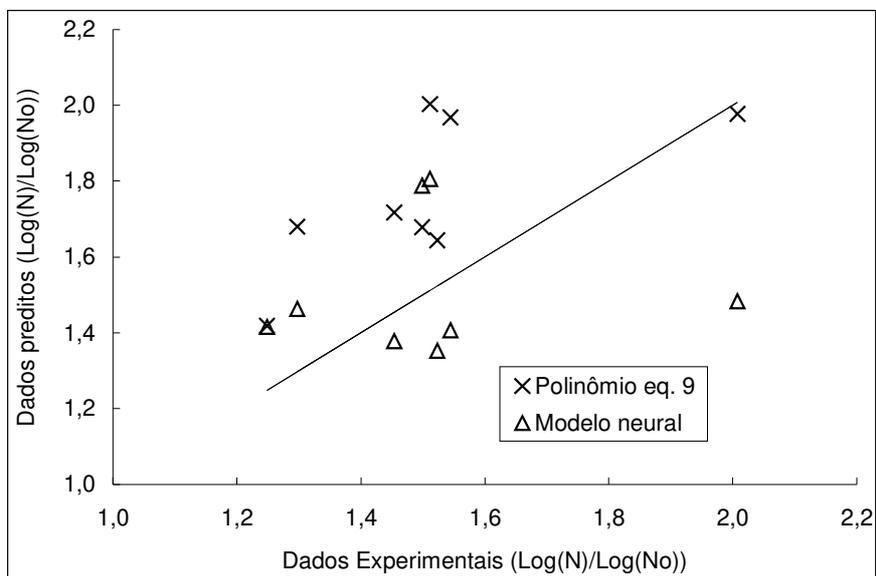
Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodrigues de Massaguer

Figura 4. Comparação das previsões e resíduos de RNA e do modelo quadrático na implementação dos modelos.



Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodrigues de Massaguer

Figura 5. Comparação das previsões e resíduos de RNA e do modelo quadrático na validação dos modelos.



Wilmer Edgard Luera Peña e Pilar Rodrigues de Massaguer

Conclusão geral

Conclusões importantes foram obtidas deste trabalho:

1. O uso da nisina é uma opção para o controle de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã;
2. O modelo probabilístico de regressão logística resultou ser importante ferramenta para determinar a resposta microbiana em valores críticos dos fatores, assim como prever probabilidades de crescimento para as diferentes combinações das variáveis estudadas;
3. Assim, suco de laranja simples (11 °Brix) com pH entre 3,5 a 3,7 pode se manter estável suportando até 36°C de abuso de temperatura, desde que adicionado 70 IU de nisina/ml, estendendo desta maneira a sua vida de prateleira por até 47 dias com probabilidade de crescimento de 0,05. No caso de suco de maçã (11 °Brix e pH 3,5) com probabilidade de 0,05 de crescimento, concentrações de nisina de 1,8 e 18,4IU/ml serão necessárias para o suco suportar temperaturas de abuso de incubação de 35 e 45°C respectivamente por até 16 dias;
4. O modelo primário de Baranyi & Robertz ajustou melhor os dados de crescimento bacteriano do que o modelo de Gompertz. Usando esses modelos foi estimado o tempo mínimo para a população microbiana atingir 10^4 UFC/ml, Assim, para as condições (45,5°C, pH 5,1, 17,5IU/ml e 13°Brix); (45,5°C, pH 5,1, 52,5IU/ml e 13°Brix); (37°C, pH 5,8, 35IU/ml e 15°Brix) e (37°C, pH 4,4, 0IU/ml e 15°Brix), 16,5; 23; 30 e 1, dias seriam suficientes para atingir esse nível de população bacteriana;

5. O modelo de superfície de resposta mostrou que o tempo de adaptação do *A. acidoterrestris* em suco de laranja foi afetado principalmente pela temperatura (20 a 54°C) seguido pelo pH (3 a 5,8), Nisina (0 a 70 IU/ml) e concentração de sólidos solúveis (11 a 19°Brix). Sendo significativos os quatro fatores no nível linear e quadrático e as interações pH*Nisina, temperatura*Brix, nisina*Brix, temperatura *nisina e pH*Brix. Tempos de adaptação de pelo menos 47 dias foram encontrados experimentalmente para várias combinações dos fatores (28,5°C, pH 3,7, 17,5 IU/ml e 17°Brix); (45,5°C, pH 3,7, 52,5 IU/ml) e (17°Brix e, 28,5°C, pH 5,1, 52,5 IU/ml e 17°Brix). Por outro lado, usando o modelo implementado, podem ser preditas situações novas não usadas no planejamento experimental. Assim, para sucos com 12°Brix, pH 4,0, seria necessário 54IU de nisina/ml para se manter estáveis microbiologicamente por até 47, 38 e 32 dias quando incubadas a temperaturas de 25, 30 e 35°C respectivamente;
6. A nisina é uma opção como coadjuvante do tratamento térmico na redução da resistência térmica destes esporos conseguindo-se 29%, 26%, 23% e 21% de redução do valor D a 92, 95, 98 e 102°C respectivamente quando 100IU de nisina/ml de suco foi adicionada. Maiores concentrações não alteram esse resultado. O tempo de processo de pasteurização de suco concentrado de laranja a 102°C pode ser reduzido de 10min sem nisina para 7,9min com adição de 100IU/ml, e conseguir 5 reduções decimais de esporos, de *A. acidoterrestris*. O modelo quadrático obtido descreveu bem os dados de valor D. Sendo significativas no nível linear a nisina e temperatura e, no nível quadrático a temperatura;

7. Em suco de maçã, 70IU de nisina/ml de suco foi suficiente para inibir o crescimento do *A. acidoterrestris* para as condições ensaiadas (pH de 3,5 a 5,50; temperatura de 25 a 50°C e Brix de 11 a 19). A rede neural artificial com 4 neurônios na camada escondida foi a melhor topologia para representar o sistema estudado. O modelo polinomial encontrado foi estatisticamente significativo. Contudo as predições realizadas por RNA baseadas nos índices estatísticos MARR, MRPR, MRSR e gráficos foram levemente melhores do que os preditos pelo modelo quadrático polinomial tanto na implementação dos modelos como na validação;
8. Os modelos gerados (superfície de resposta para o tempo de adaptação, polinomial para o valor D, probabilístico tanto para suco de maçã e laranja, e o modelo neural, bem como os de Gompertz e Baranyi e Roberts) mostraram que as técnicas de modelagem em microbiologia preditiva auxiliam e podem ser de grande ajuda no controle de qualidade microbiológica de suco de frutas.

ANEXOS

Anexo – Capítulo 3

Tabela A3.1.: Dados de crescimento: experimentais e ajustados pelos modelos de Baranyi e Gompertz, usando o programa DMFIT de Baranyi (1996). Ensaios 20, 21 23 e 25.

ensaio 20						ensaio 21						ensaio 23						ensaio 25					
Exp		PG		PB		Exp		PG		PB		Exp		PG		PB		Exp		PG		PB	
Tempo (dias)	Log (N)																						
0	2,30	0,0	2,06	0,0	2,03	0	2,30	0,0	3,28	0,0	2,30	9	2,26	0,0	2,21	0,0	2,18	0	2,30	0,0	2,29	0,0	2,34
9	1,70	2,4	2,06	2,4	2,03	1	4,40	1,2	3,54	1,2	4,53	16	2,18	2,4	2,21	2,4	2,18	16	2,48	2,4	2,29	2,4	2,34
16	2,40	4,7	2,06	4,7	2,03	2	5,10	2,3	3,79	2,3	5,21	18	2,30	4,7	2,21	4,7	2,18	18	2,40	4,7	2,29	4,7	2,34
18	2,48	7,1	2,06	7,1	2,03	4	5,90	3,5	4,05	3,5	5,74	23	2,18	7,1	2,21	7,1	2,18	21	2,90	7,1	2,29	7,1	2,34
21	2,70	9,4	2,07	9,4	2,04	5	6,32	4,6	4,30	4,6	6,14	27	2,48	9,4	2,21	9,4	2,18	23	2,98	9,4	2,29	9,4	2,34
23	2,88	11,8	2,08	11,8	2,08	9	6,70	5,8	4,54	5,8	6,42	31	3,00	11,8	2,21	11,8	2,19	27	3,00	11,8	2,31	11,8	2,34
27	3,86	14,1	2,13	14,1	2,16	16	7,00	6,9	4,78	6,9	6,61	34	3,30	14,1	2,21	14,1	2,19	31	3,40	14,1	2,36	14,1	2,35
31	3,88	16,5	2,26	16,5	2,31	18	7,30	8,1	5,00	8,1	6,74	39	3,40	16,5	2,21	16,5	2,19	34	3,41	16,5	2,46	16,5	2,41
34	4,36	18,8	2,48	18,8	2,54	21	6,54	9,2	5,21	9,2	6,82	41	3,48	18,8	2,21	18,8	2,20	39	3,48	18,8	2,61	18,8	2,60
39	5,04	21,2	2,78	21,2	2,81	23	7,00	10,4	5,40	10,4	6,87	45	3,40	21,2	2,21	21,2	2,23	41	3,54	21,2	2,78	21,2	2,79
41	4,90	23,5	3,13	23,5	3,09			11,5	5,58	11,5	6,90	47	3,34	23,5	2,21	23,5	2,29	45	3,56	23,5	2,95	23,5	2,97
45	4,85	25,9	3,48	25,9	3,39			12,7	5,74	12,7	6,92			25,9	2,32	25,9	2,40	47	3,53	25,9	3,10	25,9	3,11
47	4,60	28,2	3,80	28,2	3,68			13,8	5,89	13,8	6,93			28,2	2,64	28,2	2,60			28,2	3,22	28,2	3,22
		30,6	4,08	30,6	3,98			15,0	6,03	15,0	6,93			30,6	2,98	30,6	2,88			30,6	3,32	30,6	3,31
		32,9	4,31	32,9	4,27			16,1	6,16	16,1	6,94			32,9	3,20	32,9	3,21			32,9	3,39	32,9	3,38
		35,3	4,48	35,3	4,55			17,3	6,27	17,3	6,94			35,3	3,32	35,3	3,38			35,3	3,44	35,3	3,43
		37,6	4,62	37,6	4,76			18,4	6,37	18,4	6,94			37,6	3,37	37,6	3,40			37,6	3,48	37,6	3,47
		40,0	4,72	40,0	4,83			19,6	6,46	19,6	6,94			40,0	3,40	40,0	3,40			40,0	3,51	40,0	3,50
		42,3	4,80	42,3	4,84			20,7	6,54	20,7	6,94			42,3	3,41	42,3	3,40			42,3	3,53	42,3	3,53
		44,7	4,86	44,7	4,84			21,9	6,62	21,9	6,94			44,7	3,41	44,7	3,40			44,7	3,54	44,7	3,54
		47,0	4,90	47,0	4,84			23,0	6,68	23,0	6,94			47,0	3,41476	47,0	3,40			47,0	3,55	47,0	3,56

Exp: dado experimental; PG: predito Gompertz; PB: predito Baranyi

Tabela A3.2.: Dados de crescimento: experimentais e ajustados pelos modelos de Baranyi e Gompertz, usando o programa DMFIT de Baranyi (1996). Ensaios 2, 4, 6 e 8.

ensaio 2						ensaio 4						ensaio 6						ensaio 8					
Exp		PG		PB		Exp		PG		PB		Exp		PG		PB		Exp		PG		PB	
Tempo (dias)	Log (N)																						
0	2,30	0,0	2,26	0,0	2,26	0	2,30	0,0	2,21	0,0	2,18	0	2,30	0,0	1,89	0,0	1,69	0	2,30	0,0	1,98	0,0	1,98
5	2,08	2,4	2,26	2,4	2,26	3	2,00	2,4	2,21	2,4	2,18	5	1,48	2,4	1,89	2,4	1,69	5	1,70	2,4	1,98	2,4	1,98
7	2,27	4,7	2,26	4,7	2,26	5	2,00	4,7	2,21	4,7	2,18	7	1,48	4,7	1,89	4,7	1,69	7	2,00	4,7	1,98	4,7	1,98
11	2,28	7,1	2,26	7,1	2,26	7	2,41	7,1	2,21	7,1	2,18	11	1,48	7,1	1,89	7,1	1,69	11	2,00	7,1	1,98	7,1	1,99
13	2,31	9,4	2,26	9,4	2,26	13	2,87	9,4	2,21	9,4	2,19	17	1,70	9,4	1,89	9,4	1,69	17	2,54	9,4	2,00	9,4	2,00
17	2,32	11,8	2,26	11,8	2,26	17	4,00	11,8	2,34	11,8	2,40	20	1,90	11,8	1,89	11,8	1,69	20	3,48	11,8	2,07	11,8	2,07
21	2,30	14,1	2,26	14,1	2,26	20	5,04	14,1	3,00	14,1	3,13	24	2,00	14,1	1,89	14,1	1,70	22	3,95	14,1	2,26	14,1	2,30
24	2,30	16,5	2,26	16,5	2,26	22	6,00	16,5	4,04	16,5	3,94	28	2,04	16,5	1,90	16,5	1,72	26	4,48	16,5	2,60	16,5	2,69
26	2,48	18,8	2,26	18,8	2,26	24	6,00	18,8	4,91	18,8	4,75	32	2,08	18,8	1,91	18,8	1,76	28	4,83	18,8	3,07	18,8	3,12
28	2,60	21,2	2,26	21,2	2,27	26	5,95	21,2	5,44	21,2	5,54	35	2,30	21,2	1,95	21,2	1,83	32	5,30	21,2	3,60	21,2	3,57
32	2,65	23,5	2,30	23,5	2,32	28	5,95	23,5	5,73	23,5	5,92	38	2,34	23,5	2,00	23,5	1,91	35	5,90	23,5	4,12	23,5	4,01
34	2,71	25,9	2,45	25,9	2,45	32	5,93	25,9	5,87	25,9	5,94	40	2,54	25,9	2,08	25,9	2,00	38	6,00	25,9	4,59	25,9	4,45
35	2,73	28,2	2,60	28,2	2,58	36	5,89	28,2	5,94	28,2	5,94	42	2,74	28,2	2,16	28,2	2,09	42	5,85	28,2	4,98	28,2	4,88
38	2,74	30,6	2,68	30,6	2,67	38	5,94	30,6	5,97	30,6	5,94	44	2,75	30,6	2,25	30,6	2,17	47	6	30,6	5,28	30,6	5,28
42	2,74	32,9	2,71	32,9	2,71	42	5,90	32,9	5,99	32,9	5,94	47	2,74	32,9	2,34	32,9	2,26			32,9	5,51	32,9	5,60
47	2,74	35,3	2,72	35,3	2,72	47	5,89	35,3	5,99	35,3	5,94			35,3	2,42	35,3	2,35			35,3	5,69	35,3	5,81
		37,6	2,73	37,6	2,73			37,6	6,00	37,6	5,94			37,6	2,49	37,6	2,44			37,6	5,81	37,6	5,91
		40,0	2,73	40,0	2,73			40,0	6,00	40,0	5,94			40,0	2,54	40,0	2,52			40,0	5,91	40,0	5,95
		42,3	2,73	42,3	2,73			42,3	6,00	42,3	5,94			42,3	2,59	42,3	2,61			42,3	5,97	42,3	5,96
		44,7	2,73	44,7	2,73			44,7	6,00	44,7	5,94			44,7	2,63	44,7	2,70			44,7	6,02	44,7	5,97
		47,0	2,73	47,0	2,73			47,0	6,00	47,0	5,94			47,0	2,66	47,0	2,78			47,0	6,05	47,0	5,97

Exp: dado experimental; PG: predito Gompertz; PB: predito Baranyi

Tabela A3.3.: Dados de crescimento: experimentais e ajustados pelos modelos de Baranyi e Gompertz, usando o programa DMFIT de Baranyi (1996). Ensaios 10, 12, e 16.

ensaio 10						ensaio 12						ensaio 16					
Exp		PG		PB		Exp		PG		PB		Exp		PG		PB	
Tempo (dias)	Log (N)	Tempo (dias)	Log (N)	Dias	Log (N)	Tempo (dias)	Log (N)										
0	2,30	0,0	2,20	0,0	2,23	0	2,30	0,0	2,30	0,0	2,29	0	2,30	0,0	2,27	0,0	2,27
7	2,00	2,4	2,20	2,4	2,23	26	2,40	2,4	2,30	2,4	2,29	11	2,18	2,4	2,27	2,4	2,27
11	2,26	4,7	2,20	4,7	2,23	28	2,54	4,7	2,30	4,7	2,29	13	2,32	4,7	2,27	4,7	2,27
17	2,24	7,1	2,20	7,1	2,23	30	2,74	7,1	2,30	7,1	2,29	22	2,30	7,1	2,27	7,1	2,27
20	2,23	9,4	2,20	9,4	2,23	35	2,89	9,4	2,30	9,4	2,29	28	2,30	9,4	2,27	9,4	2,27
22	2,26	11,8	2,20	11,8	2,23	40	2,95	11,8	2,30	11,8	2,29	36	2,70	11,8	2,27	11,8	2,27
24	2,26	14,1	2,21	14,1	2,23	44	2,94	14,1	2,30	14,1	2,29	40	2,75	14,1	2,27	14,1	2,27
28	2,31	16,5	2,21	16,5	2,23	47	2,95	16,5	2,30	16,5	2,29	42	2,83	16,5	2,27	16,5	2,27
32	2,34	18,8	2,22	18,8	2,23			18,8	2,31	18,8	2,30	44	2,85	18,8	2,27	18,8	2,27
34	2,38	21,2	2,24	21,2	2,23			21,2	2,34	21,2	2,32	47	2,84	21,2	2,28	21,2	2,27
35	2,48	23,5	2,26	23,5	2,23			23,5	2,42	23,5	2,36			23,5	2,29	23,5	2,27
36	2,54	25,9	2,29	25,9	2,23			25,9	2,51	25,9	2,44			25,9	2,31	25,9	2,29
38	2,78	28,2	2,33	28,2	2,24			28,2	2,62	28,2	2,55			28,2	2,36	28,2	2,32
40	2,90	30,6	2,38	30,6	2,27			30,6	2,71	30,6	2,70			30,6	2,43	30,6	2,41
42	2,98	32,9	2,44	32,9	2,34			32,9	2,79	32,9	2,84			32,9	2,51	32,9	2,52
44	2,98	35,3	2,51	35,3	2,49			35,3	2,84	35,3	2,93			35,3	2,59	35,3	2,63
47	2,98	37,6	2,58	37,6	2,69			37,6	2,88	37,6	2,94			37,6	2,67	37,6	2,73
		40,0	2,66	40,0	2,89			40,0	2,90	40,0	2,94			40,0	2,73	40,0	2,80
		42,3	2,74	42,3	2,98			42,3	2,92	42,3	2,94			42,3	2,79	42,3	2,82
		44,7	2,81	44,7	2,98			44,7	2,93	44,7	2,94			44,7	2,83	44,7	2,83
		47,0	2,89	47,0	2,98			47,0	2,94	47,0	2,94			47,0	2,86	47,0	2,83

Exp: dado experimental; PG: predito Gompertz; PB: predito Baranyi

Tabela A3.4. Parâmetros de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris* para as condições das Tabelas A2.1, e A2.2 e A2.3, estimados pelos modelos de Gompertz e Baranyi.

Ensaio	Modelo	Tempo de adaptação (dias)	Taxa de crescimento (log((ufc/mL)/dia))	População máxima Log(UFC/mL)	r ²
2	Gompertz	23,3	0,0735	2,73	0,92
	Baranyi	24,0	0,1038	2,73	0,92
4	Gompertz	12,4	0,452	5,99	0,98
	Baranyi	11,3	0,345	5,94	0,99
6	Gompertz	27,2	0,038	2,65	0,63
	Baranyi	31,0	0,037	2,78	0,77
8	Gompertz	14	0,229	6,13	0,98
	Baranyi	12,8	0,191	5,97	0,98
20	Gompertz	16,4	0,151	5,01	0,95
	Baranyi	16,0	0,126	4,84	0,96
21	Gompertz	-	0,22	7,00	-
	Baranyi	1,0	1,00	6,99	0,97
23	Gompertz	25,4	0,158	3,40	0,98
	Baranyi	25,0	0,180	3,40	0,98
25	Gompertz	14,5	0,07	3,56	0,95
	Baranyi	16,2	0,16	3,58	0,96
10	Gompertz	26,4	0,03	3,71	0,79
	Baranyi	32,0	0,09	2,97	0,94
12	Gompertz	21,1	0,04	2,95	0,90
	Baranyi	25,2	0,07	2,94	0,96
16	Gompertz	26,1	0,035	2,95	0,94
	Baranyi	29,0	0,053	2,84	0,96

Anexo – Capítulo 4

Anexo 4.1. Ajuste estatístico dos dados de sobreviventes a 92°C.

Tempo (min)	N	log(N)						
0	6,2000E+06	6,792391689						
17,5	1,4500E+06	6,161368002						
35,5	3,8500E+05	5,58546073						
53,5	8,8000E+04	4,944482672						
71,5	9,5000E+03	3,977723605						
89,5	2,1000E+03	3,322219295						
RESUMO DOS RESULTADOS								
<i>Estadística de regressão</i>			D	25,56284649				
R múltiplo	0,996729677							
R-Quadrado	0,993470049							
R-quadrado ajustado	0,991837561							
Erro padrão	0,118934454							
Observações	6							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	8,608355376	8,608355376	608,5619908	1,6025E-05			
Resíduo	4	0,056581617	0,014145404					
Total	5	8,664936993						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,874675305	0,08576632	80,15588508	1,45197E-07	6,636549332	7,112801278	6,636549332	7,112801278
Variável X 1	-0,039119274	0,001585763	-24,66904925	1,6025E-05	-0,043522068	-0,03471648	-0,043522068	-0,03471648

Anexo 4.2. Ajuste estatístico dos dados de sobreviventes a 95°C.

Tempo (min)	N	log(N)						
0	5,8000E+06	6,763427994						
9,5	5,0000E+05	5,698970004						
19,5	1,2500E+05	5,096910013						
29,5	1,7500E+04	4,243038049						
39,5	2,5500E+03	3,40654018						
49,5	8,0000E+02	2,903089987						
RESUMO DOS RESULTADOS								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,995466974	D 12,86267						
R-Quadrado	0,990954496							
R-quadrado ajustado	0,98869312							
Erro padrão	0,154258524							
Observações	6							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	10,4274777	10,427478	438,20863	3,07759E-05			
Resíduo	4	0,09518277	0,0237957					
Total	5	10,52266047						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,596544749	0,110912474	59,475228	4,786E-07	6,288601715	6,904487784	6,288601715	6,904487784
Variável X 1	-0,077744354	0,003713885	-20,933433	3,078E-05	-0,088055772	-0,067432936	-0,088055772	-0,067432936

Anexo 4.3. Ajuste estatístico dos dados de sobreviventes a 98°C.

Tempo (min)	N	Log(N)						
0	6,40E+06	6,806179974						
4,5	2,85E+05	5,45484486						
9,5	5,85E+04	4,767155866						
14,5	5,60E+03	3,748188027						
19,5	1,90E+03	3,278753601						
24,5	5,00E+02	2,698970004						
RESUMO DOS RESULTADOS								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,983308121							
R-Quadrado	0,966894861		D	6,15934687				
R-quadrado ajustado	0,958618577							
Erro padrão	0,309737868							
Observações	6							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	11,20811147	11,2081115	116,827163	0,000415603			
Resíduo	4	0,383750188	0,09593755					
Total	5	11,59186166						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,420803478	0,221206644	29,0262686	8,3861E-06	5,806634101	7,034972854	5,806634101	7,034972854
Variável X 1	-0,162354876	0,015020812	-10,808661	0,0004156	-0,204059424	-0,120650329	-0,204059424	-0,120650329

Anexo 4.4. Ajuste estatístico dos dados de sobreviventes a 102°C

Tempo (min)	N	Log(N)						
0	8,00E+04	4,903089987						
1	1,90E+04	4,278753601						
2	5,00E+03	3,698970004						
3	2,10E+03	3,322219295						
4	8,00E+02	2,903089987						
RESUMO DOS RESULTADOS								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,993956474							
R-Quadrado	0,987949472							
R-quadrado ajustado	0,983932629							
Erro padrão	0,09994318							
Observações	5							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	2,456723233	2,456723233	245,951742	0,000563476			
Resíduo	3	0,029965918	0,009988639					
Total	4	2,486689151						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	4,812531436	0,077415655	62,16483556	9,17132E-06	4,566160041	5,058902831	4,566160041	5,058902831
Variável X 1	-0,495653431	0,031604809	-15,68284866	0,000563476	-0,596234131	-0,39507273	-0,596234131	-0,39507273

D 2,01753874

Anexo 4.5. Análise estatística para cálculo do valor z.

Temperatura	valor D	log(D)						
92	25,56284649	1,407609212						
95	12,86267033	1,109331139						
98	6,159346874	0,789534663						
102	2,017538744	0,304821884						
RESUMO DOS RESULTADOS								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,998868374							
R-Quadrado	0,997738028							
R-quadrado ajustado	0,996607041							
Erro padrão	0,027484164							
Observações	4							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	0,666383555	0,6663836	882,1840782	0,001131626			
Resíduo	2	0,001510759	0,0007554					
Total	3	0,667894314						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	11,57667305	0,359632334	32,190301	0,000963656	10,02929893	13,12404717	10,02929893	13,12404717
Variável X 1	-0,110324019	0,003714415	-29,701584	0,001131626	-0,126305869	-0,094342168	-0,126305869	-0,094342168

Anexo 4.6. Análise estatística dos dados de sobreviventes com adição de nisina para 92°C.

Tempo (min)	50 (UI/mL)	75 (UI/mL)	100 (UI/mL)	Log(N)	Log(N)	Log(N)
	N	N	N	Log(N)	Log(N)	Log(N)
0	8,05E+06	1,25E+07	2,00E+07	6,90579588	7,096910013	7,301029996
18,5	1,05E+06	1,40E+06	2,23E+06	6,0211893	6,146128036	6,348304863
37,5	3,25E+05	3,30E+05	2,20E+05	5,51188336	5,51851394	5,342422681
56,5	3,80E+04	4,20E+04	3,30E+04	4,5797836	4,62324929	4,51851394
75,5	3,20E+03	1,50E+03	1,00E+03	3,50514998	3,176091259	3

RESUMO DOS RESULTADOS (50 UI)

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,993617765
R-Quadrado	0,987276263
R-quadrado ajustado	0,983035017
Erro padrão	0,170866476
Observações	5

D 22,9265333

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6,796087875	6,796087875	232,779785	0,000611472
Resíduo	3	0,087586058	0,029195353		
Total	4	6,883673933			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,944781595	0,131884938	52,65788287	1,5084E-05	6,525064469	7,364498722	6,525064469	7,364498722
Variável X 1	-0,043617584	0,002858834	-15,2571224	0,00061147	-0,052715679	-0,034519489	-0,052715679	-0,034519489

...Continuação do anexo 4.6.

RESUMO DOS RESULTADOS (75 UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,989495726							
R-Quadrado	0,979101792							
R-quadrado ajustado	0,972135722							
Erro padrão	0,249843129							
Observações	5							
D 20,1781084								
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	8,773540104	8,773540104	140,552976	0,00129032			
Resíduo	3	0,187264768	0,062421589					
Total	4	8,960804872						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	7,175584101	0,192843829	37,20930102	4,2696E-05	6,561868392	7,789299809	6,561868392	7,789299809
Variável X 1	-0,049558659	0,004180224	-11,855504	0,00129032	-0,062862009	-0,036255309	-0,062862009	-0,036255309
RESUMO DOS RESULTADOS (100UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,994593004							
R-Quadrado	0,989215243							
R-quadrado ajustado	0,985620324							
Erro padrão	0,198907289							
Observações	5							
D 18,1140828								
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	10,88687085	10,88687085	275,170375	0,000476887			
Resíduo	3	0,118692328	0,039564109					
Total	4	11,00556317						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	7,377787332	0,15352851	48,05483588	1,9842E-05	6,889190635	7,866384028	6,889190635	7,866384028
Variável X 1	-0,055205666	0,003327996	-16,5882602	0,00047689	-0,065796845	-0,044614487	-0,065796845	-0,044614487

Anexo 4.7. Análise estatística dos dados de sobreviventes com adição de nisina para 95°C.

Tempo (min)	50(UI/mL) N	75(UI/mL) N	100(UI/mL) N	Log(N)	Log(N)	Log(N)
0	8,20E+06	1,35E+07	7,35E+06	6,913813852	7,130333768	6,866287339
8,5	1,35E+06	1,90E+06	1,02E+06	6,130333768	6,278753601	6,008600172
17,5	2,50E+05	6,50E+05	8,00E+04	5,397940009	5,812913357	4,903089987
26,5	5,50E+04	3,80E+04	2,30E+04	4,740362689	4,579783597	4,361727836
35,5	5,00E+03	5,50E+03	1,00E+03	3,698970004	3,740362689	3

RESUMO DOS RESULTADOS (50UI)

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997184865
R-Quadrado	0,994377655
R-quadrado ajustado	0,99250354
Erro padrão	0,107365614
Observações	5

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6,116254111	6,116254111	530,5851589	0,000179225
Resíduo	3	0,034582125	0,011527375		
Total	4	6,150836236			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,922741636	0,082539816	83,87154179	3,73598E-06	6,660062857	7,185420415	6,660062857	7,185420415
Variável X 1	-0,087866907	0,003814589	-23,0344342	0,000179225	-0,100006645	-0,07572717	-0,100006645	-0,07572717

...Continuação do anexo 4.7.

RESUMO DOS RESULTADOS (75UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,992456289							
R-Quadrado	0,984969486							
R-quadrado ajustado	0,979959314			D	10,49281845			
Erro padrão	0,191311098							
Observações	5							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	7,195326748	7,195326748	196,5939704	0,000785632			
Resíduo	3	0,109799808	0,036599936					
Total	4	7,305126556						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	7,185767105	0,147074862	48,85788785	1,88804E-05	6,717708815	7,653825395	6,717708815	7,653825395
Variável X 1	-0,095303279	0,006797086	-14,02119718	0,000785632	-0,116934659	-0,073671898	-0,116934659	-0,073671898
RESUMO DOS RESULTADOS (100UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,993644609							
R-Quadrado	0,98732961							
R-quadrado ajustado	0,983106146			D	9,487896705			
Erro padrão	0,194021904							
Observações	5							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	8,800248631	8,800248631	233,7724987	0,000607621			
Resíduo	3	0,112933497	0,037644499					
Total	4	8,913182128						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,882935967	0,149158857	46,14500335	2,24059E-05	6,408245467	7,357626466	6,408245467	7,357626466
Variável X 1	-0,105397438	0,006893398	-15,28962062	0,000607621	-0,127335327	-0,083459548	-0,127335327	-0,083459548

Anexo 4.8. Análise estatística dos dados de sobreviventes com adição de nisina para 98°C.

Tempo	50 (UI/mL) N	75 9UI/mL) N	100 9UI/mL) N	Log(N)	Log(N)	Log(N)
0	3,00E+06	6,25E+06	6,10E+06	6,477121255	6,795880017	6,785329835
4,5	1,85E+05	5,40E+05	2,50E+05	5,267171728	5,73239376	5,397940009
9	5,30E+04	6,00E+04	5,00E+04	4,72427587	4,77815125	4,698970004
13,5	9,05E+03	2,00E+04	8,00E+03	3,956648579	4,301029996	3,903089987
18	1,20E+03	1,30E+03	6,40E+02	3,079181246	3,113943352	2,806179974

RESUMO DOS RESULTADOS (50UI)

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,993320334
R-Quadrado	0,986685287
R-quadrado ajustado	0,982247049
Erro padrão	0,171927029
Observações	5

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6,57137723	6,57137723	222,31465	0,000654682
Resíduo	3	0,08867671	0,0295589		
Total	4	6,66005394			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,322160369	0,1331741	47,4728959	2,05798E-05	5,898340536	6,745980201	5,898340536	6,745980201
Variável X 1	-0,180142293	0,0120818	-14,9102196	0,000654682	-0,218592009	-0,141692577	-0,218592009	-0,141692577

...Continuação do anexo 4.8.

RESUMO DOS RESULTADOS (75UI)								
<i>Estadística de regressão</i>								
R múltiplo	0,993254426							
R-Quadrado	0,986554355							
R-quadrado ajustado	0,982072473							
Erro padrão	0,187463722							
Observações	5							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	7,73561955	7,73561955	220,1205704	0,000664389			
Resíduo	3	0,10542794	0,03514265					
Total	4	7,8410475						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,703327094	0,14520878	46,1633747	2,23792E-05	6,241207531	7,165446657	6,241207531	7,165446657
Variável X 1	-0,195449713	0,01317361	-14,8364608	0,000664389	-0,237374051	-0,153525375	-0,237374051	-0,153525375
RESUMO DOS RESULTADOS (100UI)								
<i>Estadística de regressão</i>								
R múltiplo	0,993382073							
R-Quadrado	0,986807942							
R-quadrado ajustado	0,98241059							
Erro padrão	0,199551898							
Observações	5							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	8,93620401	8,93620401	224,4095567	0,000645632			
Resíduo	3	0,11946288	0,03982096					
Total	4	9,05566689						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6,608931911	0,15457224	42,7562678	2,8159E-05	6,117013608	7,100850213	6,117013608	7,100850213
Variável X 1	-0,210069994	0,01402308	-14,9803056	0,000645632	-0,254697729	-0,16544226	-0,254697729	-0,16544226

Anexo 4.9. Análise estatística dos dados de sobreviventes com adição de nisina para 102°C.

Tempo (min)	100 (UI/mL)	75 (UI/mL)	50 (UI/mL)	Log(N)	Log(N)	Log(N)		
	N	N	N	Log(N)	Log(N)	Log(N)		
0,00	6,50E+04	7,10E+04	6,00E+04	4,812913357	4,851258349	4,77815125		
0,83	2,00E+04	1,50E+04	2,20E+04	4,301029996	4,176091259	4,342422681		
1,67	7,50E+03	6,00E+03	6,50E+03	3,875061263	3,77815125	3,812913357		
2,50	2,00E+03	2,50E+03	3,00E+03	3,301029996	3,397940009	3,477121255		
3,33	5,00E+02	5,00E+02	8,50E+02	2,698970004	2,698970004	2,929418926		
RESUMO DOS RESULTADOS (100UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,998031368							
R-Quadrado	0,996066612							
R-quadrado ajustado	0,994755483			D	1,594015671			
Erro padrão	0,059979761							
Observações	5							
ANOVA								
	gl	SQ	MQ	F	F de significação			
Regressão	1	2,73307994	2,73307994	759,701309	0,000104822			
Resíduo	3	0,010792715	0,00359757					
Total	4	2,743872655						
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	4,843378264	0,046460123	104,248072	1,94591E-06	4,695521279	4,99123525	4,695521279	4,99123525
Variável X 1	-0,627346405	0,022760719	-27,5626796	0,000104822	-0,699781238	-0,554911571	-0,699781238	-0,554911571

...Continuação do anexo 4.8.

RESUMO DOS RESULTADOS (75UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,993167331							
R-Quadrado	0,986381348							
R-quadrado ajustado	0,981841797			D	1,639539522			
Erro padrão	0,109038753							
Observações	5							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	2,58341233	2,58341233	217,2861166	0,000677289			
Resíduo	3	0,035668349	0,01188945					
Total	4	2,619080679						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	4,797027762	0,084461055	56,795736	1,20237E-05	4,528234739	5,065820786	4,528234739	5,065820786
Variável X 1	-0,609927353	0,041377297	-14,7406281	0,000677289	-0,741608504	-0,478246202	-0,741608504	-0,478246202
RESUMO DOS RESULTADOS (50UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,998006843							
R-Quadrado	0,996017659							
R-quadrado ajustado	0,994690213			D	1,826377508			
Erro padrão	0,052674843							
Observações	5							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	2,081883426	2,08188343	750,3258374	0,000106786			
Resíduo	3	0,008323917	0,00277464					
Total	4	2,090207343						
	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	4,780558709	0,040801758	117,165507	1,37075E-06	4,650709182	4,910408235	4,650709182	4,910408235
Variável X 1	-0,547531929	0,019988698	-27,3920762	0,000106786	-0,611144946	-0,483918912	-0,611144946	-0,483918912

Anexo 4.9. Análise estatística para cálculo do valor z para diferentes concentrações de nisina.

Temperatura (°C)	Valor de D (min)			Log(D)	Log(D)	Log(D)
	50 (UI/mL)	75 (UI/mL)	100 (UI/mL)			
92	22,90	20,09586035	18,06125346	1,35983548	1,303106604	1,256747887
95	11,38	10,49	9,49	1,05617466	1,020892159	0,977169948
98	5,551167278	5,116405563	4,760318118	0,74438431	0,708964962	0,677635976
102	1,83	1,64	1,59	0,26159055	0,21472189	0,202492587

RESUMO DOS RESULTADOS (50UI)

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998971946
R-Quadrado	0,997944949
R-quadrado ajustado	0,996917423
Erro padrão	0,026035713
Observações	4

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,658344011	0,658344011	971,211747	0,001028054
Resíduo	2	0,001355717	0,000677858		
Total	3	0,659699728			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	11,46476269	0,340679252	33,65265898	0,00088183	9,998937159	12,93058823	9,998937159	12,93058823
Variável X 1	-0,109656501	0,003518661	-31,16427036	0,00102805	-0,124796087	-0,094516914	-0,124796087	-0,094516914

...Continuação do anexo 4.9.

RESUMO DOS RESULTADOS (75UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,997875488							
R-Quadrado	0,99575549							
R-quadrado ajustado	0,993633235		z	9,18189481				
Erro padrão	0,037203361							
Observações	4							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	0,649410785	0,649410785	469,196911	0,002124512			
Resíduo	2	0,00276818	0,00138409					
Total	3	0,652178966						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	11,34896218	0,486808755	23,31297877	0,00183488	9,254391697	13,44353265	9,254391697	13,44353265
Variável X 1	-0,108909982	0,00502794	-21,6609536	0,00212451	-0,130543478	-0,087276486	-0,130543478	-0,087276486
RESUMO DOS RESULTADOS (100UI)								
<i>Estatística de regressão</i>								
R múltiplo	0,998219064							
R-Quadrado	0,996441299							
R-quadrado ajustado	0,994661948		z	9,48960843				
Erro padrão	0,032949488							
Observações	4							
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	0,607977543	0,607977543	560,002811	0,001780936			
Resíduo	2	0,002171337	0,001085669					
Total	3	0,610148881						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	10,97387431	0,431146504	25,45277348	0,00154002	9,118799337	12,82894929	9,118799337	12,82894929
Variável X 1	-0,105378426	0,00445304	-23,66437853	0,00178094	-0,124538324	-0,086218528	-0,124538324	-0,086218528

Anexo - Capítulo 6.

Código para treinamento e teste da RNA desenvolvido com o Software MATLAB®

Versão 6.5 (2002)

```
R=load('maca3treina.dat'); %carrega arquivos de dados para treinamento
M=R';
entrada=M(1:4,:); %define quais são os dados de entrada da rede (colunas 1 a 4
saida=M(5,:); %define quais são os dados de saída da rede (coluna 5)
[pn,minp,maxp,tn,mint,maxt]=premnmx(entrada,saida);
net.numinputs=size(entrada,1); %define o numero de fontes de entrada
net.numLayers=2; %numero de camadas sem considerar a camada de entrada
net=newff(minmax(pn),[6,1],{'logsig','purelin'},'trainbr');
net.trainParam.epochs=2000; %%numero de passos
net.trainParam.show=100; %atualiza no gráfico o numero de passos
net.trainParam.goal=1e-4; %convergência desejada
net.initFcn='initlay'; %função que inicia os pesos e bias
net.performFcn='sse'; %função objetivo a ser minimizada
net.trainParam.min_grad=1e-100; %mínimo gradiente
net.trainParam.mu_max=1e+100; %max MU
net=init(net); % inicializa os pesos da rede aleatoriamente
[net,tr]=train(net,pn,tn); %realiza o treinamento da rede
%foram determinados os pesos e bias da rede e arquivados temporariamente em
"net"
y=sim(net,pn); %simula com os dados de entrada do arquivo de treinamento
x=postmnmx(y,mint,maxt); % desnormaliza dados de saída
figure(1);
[m,b,r]=postreg(saida,x); %gráfico da saída real versus calculada (diagonal?)
N=load('maca4teste.dat'); %carrega arquivo com dados no visto no treinamento
B=N'
in=B(1:4,:); %dados de entrada da rede
out=B(5,:); % dados de saída da rede
```

```

[in, minin, maxin, outn, minout, maxout]=premnmx(in, out); %normaliza dados
Y=sim(net, inn); %simula com os dados de entrada do arquivo de teste
X=postmnmx(Y, minout, maxout); %desnormaliza dados de saída
figure(2);
plot(out) %gráfica a saída real do arquivo de teste
hold on
plot(X, 'g'); %gráfica a saída calculada
xlabel('ensaios');
ylabel('Log(N/N0)');
hold off;
net.IW{1} %mostra pesos entre camadas entrada/intermediaria
net.LW{2} %mostra pesos entre camada intermediaria e saída
net.b{1} %mostra bias da camada intermediaria
net.b{2} %mostra bias da camada de saída
ss=x'; %mostra dados simulados pela rede no treinamento
tt=X'; %mostra dados simulados pela rede no teste
pes_ca_oc=net.IW{1};
pes_ca_said=net.LW{2};
bias_ca_oc=net.b{1};
bias_ca_said=net.b{2};

```

Onde:

pn: matriz de entrada dos dados de treinamento,
minp: valor mínimo dos dados de entrada de treinamento,
maxp: valor máximo dos dados de entrada de treinamento,
tn: matriz de saída dos dados de treinamento,
mint: valor mínimo de saída dos dados de treinamento,
maxt: valor máximo de saída dos dados de treinamento,
premnmx, função que normaliza os dados entre -1 e 1,
net: nome da rede,
newff: comando que cria a rede,