

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Aplicação da microbiologia preditiva para modelar o
crescimento de bactérias mesófilas e lácticas em salsichas**

Suely Mitiko Kamei Nakashima

Tese para obtenção de grau de
DOUTOR

Orientadora
Profa. Dra. Bernadette D.G.M. Franco

Co-orientadora
Profa. Dra. Carmem D.S. de André

São Paulo
2001

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005879

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Nakashima, Suely Mitiko Kamei

N163a Aplicação da microbiologia preditiva para modelar o
crescimento de bactérias mesófilas e lácticas em salsichas /
Suely Mitiko Kamei Nakashima. -- São Paulo, 2001.
130p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental.

Orientador : Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo
Co-orientador : André, Carmem Diva Saldiva de

I. Microbiologia de alimentos I. T. II. Franco,
Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador III.
André, Carmem Diva Saldiva de, co-orientador.

664.07 CDD

Suely Mitiko Kamei Nakashima

**Aplicação da microbiologia preditiva para modelar o
crescimento de bactérias mesófilas e lácticas em salsichas**

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Orientador/presidente**

**Prof. Dr. Flávio Altertum
1º. Examinador**

**Prof. Dr. Massami Shimokomaki
2º. Examinador**

**Profa. Dra. Marisa Landgraf
3º. Examinador**

**Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
4º. examinador**

São Paulo, 29 de outubro de 2001.

“Até mesmo as mais longas e difíceis trajetórias ficam mais breves e fáceis quando feitas em parceria.”

Ao

*Meu pai, Sueito e
minha mãe, Massako,
pela vida, pelo amor e
educação.*

Ao

*Norio, meu marido,
pelo amor, apoio e
incentivo.*

Às

*minhas filhas, Camila e
Milena.*

À

*Dra. Ivone Delazari, minha
gerente, pelo exemplo e
grande oportunidade.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Bernadette D.G.M.Franco, pela orientação, oportunidade de estudo e conhecimentos obtidos.

À Profa. Dra. Carmem Diva Saldiva de André, pela valiosa orientação na área de estatística.

À Aline Cristina Rancan pelo excelente trabalho de tratamento estatístico dos dados.

À Neusa Narimatsu Pettinati, pelo incentivo e disponibilização da sua equipe para auxílio nas análises laboratoriais.

À Simone Limongi, Sandra Tinoco Veiga, Silvia Duarte de Medeiros, Maria Helena Silva e Anísia de Almeida Leite Veras, pelo auxílio nas análises microbiológicas.

Ao Marco Antonio Costa e sua equipe pelas análises químicas realizadas.

Ao Evandro Luís Piccart e Marcelo Veiga Mendes pela indiscutível colaboração na disponibilização das amostras.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 - Microbiologia preditiva.....	5
2.1.1 - Histórico.....	5
2.1.2 - Terminologia matemática.....	8
2.1.3 - Metodologia.....	8
2.1.3.1 - Planejamento.....	9
2.1.3.2 - Coleta de dados e análise.....	14
2.1.3.3 - Descrição matemática.....	16
2.1.3.4 - Validação.....	18
2.1.3.5 - Manutenção.....	20
2.1.4 - Níveis dos modelos.....	20
2.1.4.1 - Nível primário.....	22
2.1.4.2 - Nível secundário.....	26
2.1.4.3 - Nível terciário.....	27
2.1.5 - Comparação de modelos.....	27
2.1.6 - Problemas potenciais e soluções.....	29
2.1.7 - Perspectivas.....	31
2.2 - Deterioração de salsichas.....	32
2.2.1 - Introdução.....	32
2.2.2 - Processamento tecnológico.....	35
2.2.3 - Contaminação da matéria-prima.....	36
2.2.4 - Deterioração de origem microbiana.....	37
2.2.4.1 - Bactérias ácido lácticas.....	41

2.2.5 - "Shelf life" das salsichas.....	45
3 - OBJETIVO.....	47
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 - Descrição do experimento.....	48
4.2 - Descrição da análise dos dados.....	50
4.2.1 - Descrição das variáveis.....	50
4.2.2 - Análise descritiva dos dados.....	50
4.2.3 - Análise inferencial dos dados.....	51
4.2.3.1 - Ajuste e comparação de modelos para descrever a variação do número de bactérias por temperatura.....	51
4.2.3.2 - Ajuste de funções que relacionam os parâmetros B e M com a temperatura.....	56
4.2.3.3 - Ajuste final do modelo.....	57
4.2.3.4 - Teste das suposições do modelo.....	57
4.2.3.5 - Cálculo dos intervalos de confiança das previsões dos modelos.....	58
4.2.3.6 – Validação dos modelos.....	58
4.3 - Métodos de análise de laboratório.....	58
4.3.1 - Contagem Total de Mesófilos	58
4.3.1.1 - Métodos de referência.....	58
4.3.1.2 - Meios de cultura e reagentes.....	58
4.3.1.3 - Preparo dos meios de cultura e reagentes.....	59
4.3.1.4 - Procedimento analítico.....	59
4.3.1.5 - Expressão dos resultados.....	60
4.3.2 - Contagem de bactérias lácticas.....	61
4.3.2.1 - Método de referência.....	61
4.3.2.2 - Meios de cultura e reagentes.....	61

4.3.2.3 - Preparo dos meios de cultura e reagentes.....	61
4.3.2.4 - Procedimento analítico.....	62
4.3.3 - Determinação do valor de pH.....	63
4.3.3.1 - Método de referência.....	63
4.3.3.2 - Procedimento analítico.....	63
4.4 - Programas computacionais.....	63
4.5 - Técnicas estatísticas.....	64
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1 - Resultados e discussão da análise descritiva.....	65
5.1.1 - Comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas e comportamento do valor de pH a cada temperatura e lote.....	65
5.1.2 - Comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas e comportamento do valor de pH nas diferentes temperaturas a cada lote.....	72
5.1.3 - Comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas nos diferentes lotes a cada temperatura.....	77
5.2 - Resultados e discussão da análise inferencial.....	83
5.2.1 - Ajuste e comparação de modelos para descrever a variação do número de bactérias por temperatura.....	83
5.2.2 - Ajuste de funções que relacionam os parâmetros B e M com a temperatura.....	91
5.2.3 - Ajuste do modelo final.....	96
5.3 - Resultados e discussão do teste das suposições do modelo....	101
5.3.1 - $\epsilon \sim N(0, \sigma^2)$	101
5.3.2 - Independência das observações.....	103
5.4 - Resultados e discussão dos intervalos de confiança.....	104
5.5 - Resultados e discussão da validação dos modelos.....	108
6 - CONCLUSÕES.....	112

7 - APÊNDICE A: Fluxograma do processo de produção das salsichas	114
8 - APÊNDICE B: Tabelas de previsão.....	115
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para todas as temperaturas.....	52
Gráfico 2 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 4°C.....	53
Gráfico 3 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 8°C.....	53
Gráfico 4 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 12°C.....	53
Gráfico 5 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 16°C.....	54
Gráfico 6 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 20°C.....	54
Gráfico 7 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para todas as temperaturas.....	54
Gráfico 8 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 4°C.....	55
Gráfico 9 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 8°C.....	55
Gráfico 10 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura de 12°C.....	55
Gráfico 11 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 16°C.....	56
Gráfico 12 - Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a	

temperatura 20°C.....	56
Gráfico 13 - Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 4°C no lote 1.....	66
Gráfico 14 - Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 8°C no lote 1.....	66
Gráfico 15 - Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 12°C no lote 1.....	66
Gráfico 16 - Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 16°C no lote 1.....	67
Gráfico 17 - Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 20°C no lote 1.....	67
Gráfico 18 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 4°C no lote 2.....	67
Gráfico 19 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 8°C no lote 2.....	68
Gráfico 20 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 12°C no lote 2.....	68
Gráfico 21 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 16°C no lote 2.....	68
Gráfico 22 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 20°C no lote 2.....	69
Gráfico 23 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 4°C no lote 3.....	69
Gráfico 24 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 8°C no lote 3.....	69
Gráfico 25 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 12°C no lote 3.....	70
Gráfico 26 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 16°C no lote 3.....	70
Gráfico 27 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 20°C no lote 3.....	70
Gráfico 28 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 4°C no lote 4.....	71

Gráfico 29 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 8°C no lote 4.....	71
Gráfico 30 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 12°C no lote 4.....	71
Gráfico 31 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 16°C no lote 4.....	72
Gráfico 32 - Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 20°C no lote 4.....	72
Gráfico 33 - Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 1.....	73
Gráfico 34 - Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 1.....	73
Gráfico 35 - Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 2.....	74
Gráfico 36 - Comportamento das bactérias lácticas em todas as temperaturas para o lote 2.....	74
Gráfico 37 - Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 2.....	74
Gráfico 38 - Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 3.....	75
Gráfico 39 - Comportamento das bactérias lácticas em todas as temperaturas para o lote 3.....	75
Gráfico 40 - Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 3.....	75
Gráfico 41 - Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 4.....	76
Gráfico 42 - Comportamento das bactérias lácticas em todas as temperaturas para o lote 4.....	76
Gráfico 43 - Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 4.....	76
Gráfico 44 - Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 4°C.....	77

Gráfico 45 - Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 4°C.....	77
Gráfico 46 - Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 8°C.....	78
Gráfico 47 - Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 8°C.....	78
Gráfico 48 - Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 12°C.....	79
Gráfico 49 - Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 12°C.....	79
Gráfico 50 - Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 16°C.....	79
Gráfico 51 - Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 16°C.....	80
Gráfico 52 - Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 20°C.....	80
Gráfico 53 - Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 20°C.....	80
Gráfico 54 - Estimativas do parâmetro B em função da temperatura para bactérias mesófilas.....	91
Gráfico 55 - Estimativas do parâmetro B em função da temperatura para bactérias lácticas.....	91
Gráfico 56 - Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias mesófilas.....	92
Gráfico 57 - Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias lácticas.....	92
Gráfico 58 - Estimativas do parâmetro M em função da temperatura para bactérias mesófilas.....	93
Gráfico 59 - Estimativas do parâmetro M em função da temperatura para bactérias lácticas.....	94

Gráfico 60 - Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias mesófilas.....	94
Gráfico 61 - Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias lácticas.....	95
Gráfico 62 - Estimativa das curvas de crescimento das bactérias mesófilas para diferentes temperaturas, a partir da equação 23.....	99
Gráfico 63 - Estimativa das curvas de crescimento das bactérias lácticas para diferentes temperaturas, a partir da equação 24.....	100
Gráfico 64 - Gráfico de probabilidades normal dos resíduos do modelo final para bactérias mesófilas.....	101
Gráfico 65 - Gráfico de probabilidades normal dos resíduos do modelo final para bactérias lácticas.....	102
Gráfico 66 - Gráfico dos resíduos em função do logaritmo do número de bactérias mesófilas previsto pelo modelo final.....	103
Gráfico 67 - Gráfico dos resíduos em função do logaritmo do número de bactérias lácticas previsto pelo modelo final.....	103
Gráfico 68 - Gráfico de correlação dos valores do log do número de bactérias mesófilas observados e estimados.....	111
Gráfico 69 - Gráfico de correlação dos valores do log do número de bactérias lácticas observados e estimados.....	111

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferenciação dos principais gêneros de bactérias ácido lácticas	44
Tabela 2 -	Parâmetros e limites microbiológicos para a salsicha tipo Frankfurt.....	45
Tabela 3 -	Dados históricos de contaminação inicial de salsichas produzidas, no período de janeiro/98 a julho/99.....	82
Tabela 4 -	Contaminação inicial dos lotes analisados.....	82
Tabela 5 -	Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias mesófilas, para cada temperatura.....	84
Tabela 6 -	Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias lácticas, para cada temperatura.....	85
Tabela 7 -	Níveis descritivos dos testes para verificar a existência do efeito de temperatura nos parâmetros do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias mesófilas.....	86
Tabela 8 -	Níveis descritivos dos testes para verificar a existência do efeito de temperatura nos parâmetros do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias lácticas.....	86
Tabela 9 -	Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias mesófilas, considerando os parâmetros A e C comuns a todas as temperaturas.....	88
Tabela 10 -	Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias lácticas, considerando os parâmetros A e C comuns a todas as temperaturas.....	89

Tabela 11 - Níveis descritivos dos testes para localizar o efeito de temperatura nos parâmetros B e M do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias mesófilas.....	90
Tabela 12 - Níveis descritivos dos testes para localizar o efeito de temperatura nos parâmetros B e M do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias lácticas.....	90
Tabela 13 - Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias mesófilas.....	93
Tabela 14 - Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias lácticas.....	93
Tabela 15 - Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias mesófilas.....	95
Tabela 16 - Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias lácticas.....	95
Tabela 17 - Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, com os parâmetros B e M substituídos pela função exponencial, para as bactérias mesófilas.....	96
Tabela 18 - Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, com os parâmetros B e M substituídos pela função exponencial, para as bactérias lácticas..	97
Tabela 19 - Estimativas da velocidade de crescimento exponencial, tempo de geração e tempo de fase lag das bactérias mesófilas.....	98
Tabela 20 - Estimativas da velocidade de crescimento exponencial, tempo de geração e tempo de fase lag das bactérias lácticas.....	98
Tabela 21 - Estimativa da manutenção da qualidade das salsichas, considerando como parâmetro o limite máximo de Contagem Total de Mesófilos ($5,0 \times 10^5$ UFC/g), estabelecido por uma empresa de alimentos do Brasil.....	99

Tabela 22 -	Matriz de variâncias e covariâncias das estimativas dos parâmetros B , M , g_0 , g_1 , g_2 e g_3 para bactérias mesófilas.....	105
Tabela 23 -	Intervalos de confiança ($\gamma = 0,95$) das estimativas do logaritmo do número de bactérias mesófilas calculas a partir da equação 23.....	106
Tabela 24 -	Intervalos de confiança ($\gamma = 0,95$) das estimativas do número de bactérias mesófilas (UFC/g) calculadas partir dos dados da Tabela 23.....	107
Tabela 25 -	Dados para validação do modelo ajustado para descrever o crescimento de bactérias mesófilas em função do tempo e temperatura (equação 23).....	108
Tabela 26 -	Dados para validação do modelo ajustado para descrever o crescimento de bactérias lácticas em função do tempo e temperatura (equação 24).....	109
Tabela 27 -	Valores de MSE e MSPR para os modelos ajustados para descrever o crescimento de bactérias mesófilas (equação 23) e bactérias lácticas (equação 24).....	109
Tabela 28 -	Coefficiente de correlação linear de Pearson para bactérias mesófilas e bactérias lácticas.....	110
Tabela A -	Densidades de bactérias mesófilas (UFC/g), em salsichas armazenadas em diferentes temperaturas, calculadas a partir do modelo ajustado (equação 23).....	115
Tabela B:	Densidades de bactérias lácticas (UFC/g), em salsichas armazenadas em diferentes temperaturas, calculadas a partir do modelo ajustado (equação 24).....	120

RESUMO

O desenvolvimento, validação e aplicação da microbiologia preditiva têm sido extensivamente revisados na última década.

A microbiologia preditiva combina elementos da microbiologia, matemática e estatística, e associada à informações históricas do meio ambiente durante o processamento, distribuição e estocagem, fornece mais precisão sobre a segurança microbiológica e qualidade dos alimentos.

O objetivo deste trabalho foi ajustar e validar um modelo matemático para descrever o comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas, em salsichas armazenadas sob refrigeração (4°C e 8°C) e em condições de abuso de temperatura de estocagem (12°C, 16°C e 20°C).

Amostras de salsichas de diferentes lotes, provenientes de uma grande indústria de alimentos foram estocadas nessas temperaturas, retirando-se amostras em diferentes intervalos de tempo. As amostras foram então submetidas a análise microbiológica de contagem total de bactérias mesófilas e bactérias lácticas. A partir dos resultados dessas análises foi ajustado o modelo de Gompertz modificado, utilizando o método de Gauss-Newton de regressão não linear.

As equações ajustadas para bactérias mesófilas e lácticas, respectivamente, foram:

$$Y_i = 2,35 + 5,54 e^{-e^{-\left(0,002e^{0,16 \cdot w_i}\right) \left(t_i - (1314,61e^{-0,16 \cdot w_i})\right)}} + \varepsilon_i$$

$$Y_i = 2,04 + 5,95 e^{-e^{-\left(0,002e^{0,16 \cdot w_i}\right) \left(t_i - (1256,17e^{-0,16 \cdot w_i})\right)}} + \varepsilon_i$$

$i = 1, \dots, n$, onde:

- n é o número de observações;
- t_i é o i -ésimo instante de tempo;
- Y_i é o logaritmo do número de microrganismos no instante t_i ;
- ε_i é o erro não observável correspondente à i -ésima observação;
- w_i é a temperatura observada no instante t_i ;

SUMMARY

The development, validation and application of the predictive microbiology have been extensively reviewed in the last decade.

Predictive microbiology combines microbiology, mathematics and statistics elements, that associated with historical information related to the environment during the process, distribution and storage, provide more precision about food microbiology safety and quality.

The goal of this work was to fit and validate a mathematical model to describe the variation behavior of mesophiles and lactic acid bacteria number, present in sausages stored at refrigerated temperatures (4°C and 8°C) and at conditions of abuse temperatures (12°C, 16°C and 20°C).

Samples of different lots of sausage, from a large food industry, were stored at those temperatures, and sampled at different periods of storage. Then samples were analysed to determine the number of mesophiles and lactic acid bacteria. The Gompertz modified equation was fit based on the results of the analyses, applying the Gauss-Newton method of non linear regression.

The equations adjusted for mesophiles and lactic acid bacteria were the following:

$$Y_i = 2,35 + 5,54 e^{-e^{-(0,002e^{0,16w_i})(t_i - (1314,61e^{-0,16w_i})))}} + \varepsilon_i$$

$$Y_i = 2,04 + 5,95 e^{-e^{-(0,002e^{0,16w_i})(t_i - (1256,17e^{-0,16w_i})))}} + \varepsilon_i$$

$i = 1, \dots, n$, where

- n is the number of observations;
- t_i is the i th instant of time;
- Y_i is the logarithm of the number of microorganisms at the instant t_i ;
- ε_i is the error not observed at the i th observation;
- w_i is the observed temperature at the instant t_i ;

1 - INTRODUÇÃO

O crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos é uma preocupação de todos os envolvidos na cadeia de produção, desde os produtores primários até os processadores, distribuidores, vendedores do varejo e finalmente os consumidores (ROSS & McMEEKIN, 1991).

A garantia da segurança microbiológica e do "shelf life" dos alimentos depende da minimização do nível inicial de contaminação microbiana, destruição das populações microbianas, e/ou prevenção ou limitação da velocidade de crescimento microbiano, através do controle das propriedades intrínsecas dos alimentos (por exemplo, atividade de água e pH) e das condições de estocagem (por exemplo, temperatura, umidade relativa, e atmosfera) (McMEEKIN et al., 1997).

Seja pela saúde, lucro ou outro ponto de vista, deve-se tomar precauções para limitar o crescimento dos microrganismos. É também importante sermos capazes de avaliar o "shelf life" remanescente ou a segurança microbiológica de um produto em uma determinada etapa da cadeia produtiva. Esta avaliação auxilia nas decisões relacionadas à adequação ao consumo, avaliação dos processos ou para resolver questionamentos sobre a qualidade de um produto, por exemplo, após um manuseio inadequado. Quando os produtos são transportados por longas distâncias ou estocados por longos períodos, estas questões são especialmente importantes (ROSS & McMEEKIN, 1991).

A microbiologia preditiva combina elementos da microbiologia, matemática e estatística (McMEEKIN et al., 1993), e associada à informações históricas do meio ambiente durante o processamento,

distribuição e estocagem, fornece mais precisão nas tomadas de decisões sobre a segurança microbiológica e qualidade dos alimentos (McMEEKIN et al., 1997).

A microbiologia preditiva está baseada na hipótese de que as respostas de crescimento dos microrganismos são determinadas por condições do meio ambiente, e que estas respostas podem ser satisfatoriamente estimadas através da medida do comportamento do microrganismo de interesse em um meio de cultura ou outro sistema que apresente os mesmos níveis dos fatores ambientais aos quais este microrganismo será submetido (ROSS & McMEEKIN, 1994). Ou seja, um conhecimento detalhado da resposta de crescimento dos microrganismos a condições de interesse do meio ambiente permite uma avaliação objetiva, através de equações ou modelos matemáticos, do efeito das operações de processamento, distribuição e estocagem na segurança e qualidade microbiológica dos alimentos (McMEEKIN et al., 1993).

Todos os modelos são simplificações que representam o complexo processo bioquímico que controla o comportamento microbiano. Os fatores dos modelos devem ser simplificados à um número razoável e devem ser facilmente medidos, como por exemplo a temperatura e o pH, ou conhecidos para o alimento, por exemplo a quantidade de sal adicionado. Portanto, os modelos devem ser suficientemente complexos para fornecer previsões úteis, mas simples o suficiente para serem praticáveis. Este balanço entre a simplicidade e a complexidade significa que nenhum modelo será o melhor para todas as situações (WHITING & BUCHANAN, 1997; WHITING, 1997).

Modelos com multifatores e ampla faixa de variação baseados em meios de cultura, têm aplicação mais ampla do que modelos definidos para variáveis independentes simples como a temperatura ou aqueles baseados em um alimento específico. Os modelos com multifatores, no entanto, são provavelmente menos precisos do que os modelos mais específicos, tanto quanto ao número de fatores quanto à faixa de variação dos fatores (WHITING & BUCHANAN, 1997).

O desenvolvimento, validação e aplicação da microbiologia preditiva tem sido extensivamente revisados na última década. Estudos de modelagem têm se concentrado na descrição matemática dos efeitos das condições do meio ambiente sobre o crescimento microbiano, mais do que sobre a sobrevivência ou morte, frequentemente utilizando mais uma abordagem cinética do que uma abordagem probabilística. O efeito da temperatura como o único ou um dos fatores de controle tem sido o mais estudado.

A ênfase em modelagem envolvendo a temperatura, frequentemente em combinação com outros fatores, pode ser justificada, pelo seu papel fundamental em manter o "shelf life" adequado e a segurança dos alimentos. De fato, o abuso de temperatura é um dos principais fatores que contribuem para a ocorrência de doenças de origem alimentar. Quanto mais longo o "shelf life" e quanto maior a possibilidade de crescimento de patógenos psicrotróficos, maior a necessidade de controle da temperatura (McMEEKIN et al., 1997). A maioria dos microrganismos patogênicos não são capazes de crescer ou produzir toxinas a temperaturas abaixo de 4,4°C. (BANWART, 1989).

Os benefícios da aplicação da microbiologia preditiva são muitos, mas todos decorrentes do melhor entendimento, e conseqüente controle, da ecologia microbiana dos alimentos (ROSS & McMEEKIN, 1994).

Ecologia é o estudo de organismos no seu meio ambiente natural
(BROCK et al, 1994).

A microbiologia preditiva, através da coleta sistemática de dados de comportamento microbiano, têm acelerado nosso conhecimento sobre a ecologia dos microrganismos, tal como as observações empíricas praticadas por milhares de anos que resultaram em muitas estratégias de conservação de alimentos (McMEEKIN et al., 1997).

WHITING & BUCHANAN (1997) citam que a microbiologia preditiva pode ser aplicada para auxiliar na educação, desenvolvimento de produtos, planejamento laboratorial, controle da qualidade e avaliação de risco. Entre essas aplicações, destaca-se o controle da qualidade, onde os modelos

preditivos auxiliam nas decisões sobre o "shelf life" remanescente de um alimento ou seu destino após um período de estocagem normal ou de abuso (Figura 1).

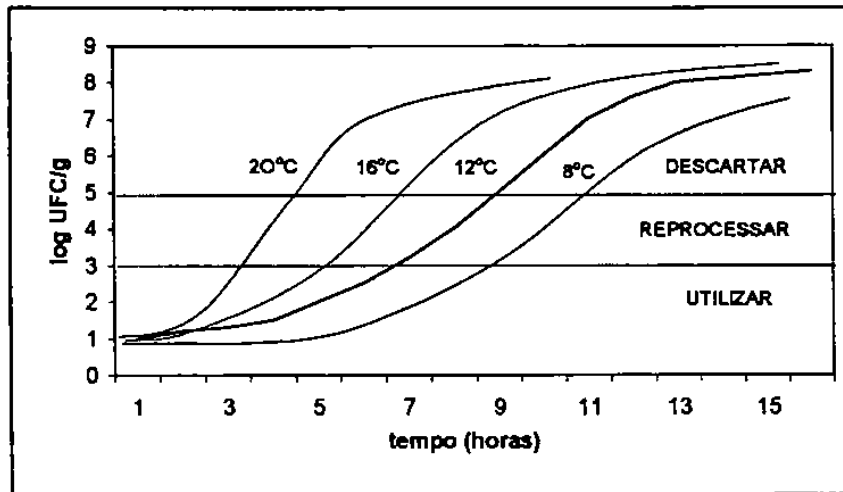


Figura 1: Representação da relação entre curvas de crescimento microbiano a diferentes temperaturas e os possíveis destinos de um alimento. (Buchanan, 1998, comunicação pessoal).

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Microbiologia preditiva

2.1.1. Histórico

O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou em aproximadamente 1920, com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos. Na época, estes modelos revolucionaram a indústria de enlatados (GOLDBLITH et al., 1961).

A aplicação de técnicas de modelagem matemática para descrever o crescimento e sobrevivência de microrganismos em alimentos, contudo, não recebeu muita atenção até a década de 80 (ROSS & McMEEKIN, 1994). Nessa época, a aceitação comercial da microbiologia preditiva era limitada, com algumas companhias do ramo alimentício no Canadá, Estados Unidos, Inglaterra e Europa utilizando a modelagem preditiva em suas operações (FARBER, 1986).

Foi a partir de 1983, que o potencial da microbiologia preditiva começou a atrair considerável interesse em pesquisa e financiamento, particularmente nos Estados Unidos e Reino Unido, e também na Austrália e Europa (ROSS & McMEEKIN, 1994).

No Reino Unido, o Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (MAFF – Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food) lançou um software denominado “Food Micromodel”, que descreve a resposta de crescimento, morte e sobrevivência de patógenos de origem alimentar, a

vários fatores ambientais (como: temperatura, pH, atividade de água, atmosfera e concentração de ácidos orgânicos, NaCl, e conservantes).

Nos Estados Unidos, pesquisas no campo da microbiologia preditiva de alimentos, centralizadas na Unidade de Pesquisa em Segurança Alimentar Microbiológica do Departamento de Agricultura (USDA – United States Department of Agriculture), resultaram na preparação e lançamento do software denominado "Pathogen Modeling Program - PMP".

Na Europa, o interesse na aplicação do conceito da microbiologia preditiva resultou no FLAIR (Food Linked Agricultural and Industrial Research), um programa envolvendo cerca de 30 laboratórios em 10 países da Comunidade Econômica Européia, atuando de forma colaborativa para avaliar a resposta de crescimento de organismos deteriorantes e patogênicos em uma grande variedade de produtos naturais (McMEEKIN et al., 1993).

Os programas de modelagem microbiana, principalmente os do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e do Ministério da Agricultura, Pesca e Alimento do Reino Unido (MAFF) criaram bancos de dados e calcularam modelos de crescimento para 10 patógenos, modelos de sobrevivência para 4 patógenos, modelos de tempo de destruição térmica para 5 patógenos e modelos de tempo de crescimento para tipos proteolíticos e não proteolíticos de *Clostridium botulinum* (WHITING, 1997).

McMEEKIN et al. (1993) apontaram dois fatores como sendo os 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.

- A conscientização, por parte de muitos microbiologistas de alimentos, de que os métodos microbiológicos tradicionais para a determinação da qualidade e segurança dos alimentos eram limitados pelo tempo necessário para se obter um resultado e tinham portanto, pouco valor preditivo; e que os métodos indiretos baseados em mudanças químicas, físicas ou físico-químicas exigiam um número muito elevado de células para fornecer uma resposta, o mesmo ocorrendo com muitos métodos rápidos propostos.

BUCHANAN (1993 a) apontou ainda um terceiro fator contribuindo para o aumento no interesse da aplicação do conceito 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. O extensivo empenho com pesquisa não teria sido de valor sem a habilidade de solucionar de forma rápida as complexas equações de modelagem.

O artigo publicado em 1983 por ROBERTS & JARVIS (1983) pode ser considerado como o marco inicial do rápido desenvolvimento da microbiologia preditiva (ROSS & McMEEKIN, 1994). Neste artigo, os autores questionam se o grau de conhecimento que se obtém a partir da abordagem tradicional da microbiologia de alimentos é suficiente para se obter a resposta de crescimento dos microrganismos nos alimentos nas condições reais de estocagem ao longo da distribuição, venda no varejo e uso doméstico. Essa abordagem tradicional, foi assim resumida: avaliações microbiológicas de produtos quanto ao número e tipo de microrganismos antes e após a estocagem, ou após um provável envolvimento em um episódio de doença de origem alimentar, e determinação das condições limites de crescimento microbiano.

2.1.2 - Terminologia matemática (MCMEEKIN et al., 1993)

A compreensão da microbiologia preditiva depende de certa familiaridade com a terminologia matemática e estatística.

Um modelo de regressão, seja um modelo linear ou não linear, consiste de dois componentes, a parte determinística e a parte estocástica.

Conforme indicado na equação genérica abaixo, a parte determinística representa a relação entre a variável de resposta e a(s) variável(eis) explanatória(s), e a parte estocástica indicada pela letra "ε", representa o quanto a resposta esperada se desvia da resposta real.

$$Y = \alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_p x_p + \varepsilon$$

Parte determinística

Parte estocástica

Onde:

Y = variável dependente (ou de resposta)

$x_1 \dots x_p$ = variáveis independentes (ou preditivas ou explanatórias)

$\alpha, \beta_1 \dots \beta_p$ = parâmetros

ε = erro

Os parâmetros quantificam a relação entre a resposta e as variáveis independentes, sendo estimados pelos dados experimentais. Os parâmetros devem ser ajustados para minimizar a diferença entre a resposta observada e a prevista pelo modelo.

2.1.3 – Metodologia

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

dos nutrientes não são conhecidos e em geral não são limitantes, e os microrganismos presentes, especialmente os patogênicos, estão inicialmente em pequeno número e frequentemente estão submetidos a condições subótimas (WHITING & BUCHANAN, 1997).

Apesar de empíricos, os modelos matemáticos definidos para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos são baseados em técnicas de regressão linear e não-linear. Como em qualquer aplicação estatística de regressão, suposições quanto a aleatoriedade, normalidade, interpolação dentro da faixa de variação dos fatores testados ao invés de extrapolações, parcimônia e especificações estocásticas devem ser estabelecidas (McMEEKIN et al., 1993; RATKOWSKY, 1993 b).

Segundo DRAPER & SMITH (1981) e FARBER (1986) os vários estágios do desenvolvimento de um modelo podem ser assim definidos:

- a) Planejamento
- b) Coleta dos dados e análise
- c) Descrição matemática
- d) Validação
- e) Manutenção

2.1.3.1 - Planejamento

Na etapa de planejamento devem ser definidas algumas características relacionadas à(s) variável(eis) independente(s), à variável dependente, ao inóculo e ao modelo experimental.

- Variável(eis) independente(s)

O comportamento microbiano em um alimento é determinado basicamente por 3 a 5 fatores ambientais, sendo usualmente, temperatura, pH, concentração de NaCl (atividade de água), e atmosfera (WHITING, 1997). ROSS & McMEEKIN (1994) incluem ainda a concentração de nitrito de sódio e de ácidos orgânicos como fatores que usualmente estão incluídos nos modelos.

Fatores adicionais, presentes em um determinado alimento, não incluídos no modelo a ser utilizado, e que têm influência significativa no comportamento de um patógeno de interesse, tomariam a sua aplicação inadequada, e a previsão provavelmente seria imprecisa (WHITING & BUCHANAN, 1997; WHITING, 1997). Por exemplo, a não inclusão da concentração de fosfato em um modelo a ser aplicado para queijos, onde a concentração deste componente é elevada (WHITING & BUCHANAN, 1997).

A faixa de variação dos fatores ambientais deve incluir valores de interesse ao usuário do modelo. Usar valores da(s) variável(eis) independente(s) fora da faixa estudada para desenvolver o modelo é muito perigoso (WHITING, 1997).

- Variável dependente

A resposta primária medida é usualmente a mudança da densidade da população bacteriana ao longo do tempo. A velocidade de mudança é frequentemente expressa como sendo a velocidade de crescimento, podendo também ser representada pelo tempo de duração da fase lag, tempo de geração, ou o tempo para se atingir uma determinada densidade.

A questão mais importante a ser considerada ao se definir uma variável dependente está relacionada com sua propriedade estocástica. É útil, apesar de não essencial, que os erros (ϵ_i) sejam "iidN", ou seja, independentes e identicamente distribuídos de acordo com uma Distribuição Normal com média zero e variância σ^2 . Se esta condição for verdadeira, a estimação dos parâmetros poderá ser conduzida através do método de mínimos quadrados. Este método está baseado na estimação dos parâmetros de forma a minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre os valores observados e aqueles estimados pelo modelo ajustado, ou seja os resíduos. Testes de hipótese e construção de intervalos de confiança para os parâmetros podem ser realizados.

Considerando que é raro o conhecimento prévio do comportamento do termo estocástico, esta questão em geral é avaliada através de uma análise dos resíduos depois do ajuste do modelo. Para se validar o comportamento do erro, é necessário estimá-lo ao longo da faixa de valores da variável de resposta.

No caso de erros independentes e normalmente distribuídos, mas com variâncias desiguais (dependente da variável de resposta), pode se ajustar o modelo de regressão pelo método de mínimos quadrados ponderados. Uma outra alternativa para erros com variâncias heterogêneas é transformar matematicamente o modelo de forma a estabilizar as variâncias (McMEEKIN et al., 1993).

O número de pontos, ou seja a quantidade de valores da variável de resposta, necessários para ajustar um modelo de crescimento ou inativação depende da complexidade desse modelo; WHITING (1997) indica que 7 a 10 pontos de "qualidade" apropriadamente distribuídos são provavelmente suficientes, enquanto que outros autores recomendam o uso de 10 a 15 pontos (McMEEKIN et al., 1993; GIBSON et al., 1987; BRATCHEL et al., 1989).

- Inóculo

Uma mistura de 3 a 5 cepas "típicas" de um mesmo patógeno é frequentemente utilizada para inocular o meio de crescimento que será modelado. Esta prática é experimentalmente viável e resulta em modelos para as cepas de crescimento mais rápido ou de maior resistência nas condições ambientais de estudo. O uso de uma mistura de cepas aumenta a probabilidade de se criar um modelo representativo da situação real.

A seleção das cepas a serem empregadas deve ser feita com cuidado pois, a não inclusão de uma cepa de ocorrência frequente e com propriedades excedendo aquelas das cepas utilizadas para a modelagem, pode ser muito perigoso. Por outro lado, a inclusão de uma cepa rara e com propriedades excepcionais, tal como a

Salmonella seftengerg 775W, que apresenta elevada resistência térmica em relação as demais cepas e que não tem sido identificada em surtos, pode resultar em um modelo excessivamente seguro.

A maior parte dos modelos de crescimento utilizam como inóculo, culturas de 18 a 24 horas em caldo nutriente, em temperaturas favoráveis (37°C) (WHITING, 1997).

Deve-se considerar, no entanto, que a duração da fase lag depende tanto da temperatura de incubação anterior quanto da nova condição de crescimento. Células adaptadas a temperaturas mais altas e então transferidas para temperaturas mais baixas apresentam fase lag mais longa. O tempo de fase lag é mínimo quando o inóculo é pré-adaptado na mesma temperatura da condição a ser modelada. A temperatura de pré-adaptação não altera a velocidade de crescimento dos microrganismos (HUDSON, 1993).

Em geral, o tamanho do inóculo parece não afetar a velocidade de crescimento exponencial ou a população 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 de determinação da variável de resposta a ser modelada.

Recomenda-se utilizar apenas preparações de células lavadas como inóculo em alimentos. Este procedimento evita o crescimento dos microrganismos no filme formado pelo meio de cultura sobre o alimento, e também elimina a necessidade de se utilizar meios de cultura que mimetizem a composição do alimento a ser inoculado (McMEEKIN et al., 1993).

- Modelo experimental (McMEEKIN et al., 1993)

O sistema experimental usado no desenvolvimento de modelos preditivos 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 uma maior variedade de métodos de detecção incluindo métodos diretos e indiretos, enquanto que com alimento, geralmente se aplica métodos diretos de Contagem de Viáveis em Placa ou Número Mais Provável (NMP). Esta característica pode ser considerada como uma das vantagens na utilização de meios de laboratório pois, com um mesmo “esforço”, os métodos indiretos possibilitam um maior número de determinações do que os métodos diretos. Devido à característica invasiva dos métodos diretos de análise, cada determinação corresponde a uma única amostra, e a menos que o alimento seja líquido, um elemento extra de variabilidade estará sendo introduzido.

A distribuição do inóculo nos meios de laboratório é mais homogênea do que nos alimentos, pois neste caso existe uma dificuldade em se aplicar o inóculo de uma forma representativa e consistente.

Os meios de laboratório podem não mimetizar com exatidão as condições do alimento ao qual pretende-se aplicar o modelo preditivo, sendo portanto, necessária uma validação neste alimento. Em contrapartida, os modelos gerados de um alimento são específicos para esse alimento apenas. A utilização de um alimento para desenvolver modelos, apresenta ainda as desvantagens de ser mais caro, dificultar a logística do experimento e introduzir complicações devido a microbiota deteriorante normal.

Devido às características de cada um dos meios de crescimento (meio de laboratório ou alimento), ROSS & McMEEKIN (1991) concluíram que os modelos cinéticos seriam melhor desenvolvidos procedendo da seguinte forma:

-Fase 1: medida da variável dependente (ou de resposta) a intervalos pequenos das variáveis independentes, em um meio líquido de laboratório;

-**Fase 2:** comparação dos dados obtidos de um crescimento no alimento, com as previsões do modelo original, definido na fase 1;

-**Fase 3:** ajuste, se necessário, do modelo original, a partir dos resultados obtidos na fase 2.

2.1.3.2 - Coleta de dados e análise

- **Definições** (McMEEKIN et al., 1993)

O significado biológico de cada uma das fases da curva de crescimento microbiano (Figura 2) pode ser assim definido:

Fase lag: ajuste da fisiologia e bioquímica das células para que possam ser capazes de explorar o ambiente onde se encontram.

Fase exponencial: fase de "crescimento balanceado", ou seja, a síntese de cada componente celular (enzimas, moléculas estruturais, DNA, etc) é ajustada para que não exista síntese além do necessário para a produção de novas células. Todo o metabolismo está direcionado para a reprodução. Nesta fase, todos os componentes celulares estão presentes em proporções constantes e as células são consideradas para aspectos práticos, fisiologicamente idênticas.

A velocidade de crescimento, na fase exponencial pode ser expressa como "velocidade de crescimento absoluta", que indica a variação do número de microrganismos com o tempo, ou como "velocidade de crescimento relativa ou específica", que indica o aumento da densidade da população em um intervalo de uma unidade de tempo, dividido pela densidade de células naquele tempo. O tempo necessário para a população microbiana dobrar é denominado de "tempo de geração".

Fase estacionária: morte celular e lise devido ao acúmulo de metabólitos "tóxicos" no meio de crescimento. Nesta fase, a velocidade de morte celular é equivalente à velocidade de crescimento. Em

condições que permitam o crescimento celular, a densidade microbiana nesta fase é tipicamente 10^9 UFC/ml.

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

A fase lag e a exponencial são as de maior interesse para os microbiologistas de alimentos, pois para a maioria dos alimentos, a deterioração ocorre antes dos microrganismos chegarem à fase estacionária.

No caso de um estudo de "shelf life" de produto, quanto maior a fase lag, maior o "shelf life", assim como, quanto maior a velocidade de crescimento na fase exponencial, menor o "shelf life".

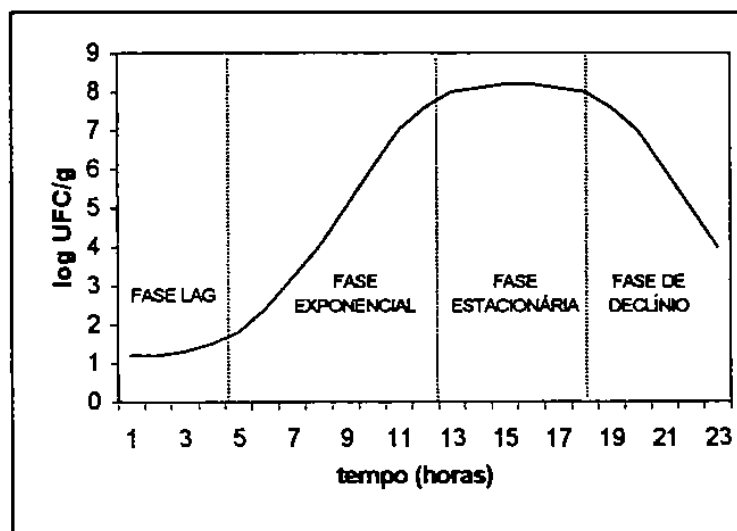


Figura 2: Fases da curva de crescimento microbiano.

- Métodos de medida

Os métodos de medida utilizados em microbiologia preditiva podem ser classificados como diretos e indiretos. Os métodos diretos distinguem e contam individualmente os organismos, enquanto que os métodos indiretos medem alguma propriedade da população total. No caso dos métodos indiretos é necessária uma calibração para

relacionar a densidade de células com o nível da propriedade medida (McMEEKIN et al., 1993)

A Contagem em Placa é o método direto preferido para a enumeração de células embora exista a possibilidade de resultados inferiores aos reais, devido a formação de cadeias ou grumos. O uso de frascos de homogeneização minimiza este problema. Uma das vantagens do plaqueamento é que o limite mínimo de detecção é menor que 20 UFC/ml. Repetidas amostragens a partir de um mesmo frasco fornecem curvas mais precisas do que a amostragem a partir de frascos separados, mas esse procedimento aumenta o potencial de contaminação (WHITING & BUCHANAN, 1997).

Apesar dos métodos indiretos de turbidimetria e condutividade apresentarem a capacidade de monitorar muitas amostras simultaneamente e permitirem uma automação destas medidas, existe uma grande desvantagem em relação ao limite de detecção (WHITING & BUCHANAN, 1997). No caso de técnicas de turbidimetria, em geral são necessárias populações acima de 10^5 ou 10^6 UFC/ml (DALGAARD et al., 1994; McCLURE et al., 1993) e para as técnicas de condutividade, 10^7 ou 10^8 UFC/ml (OWENS et al., 1989).

2.1.3.3 - Descrição matemática

A escolha de uma função para descrever uma determinada resposta é um exercício estatístico, haja vista que se está lidando com estimativas da resposta real. Em contraste, o ajuste da função escolhida aos dados 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, já discutidos no item 2.1.3.1 (McMEEKIN et al., 1993).

Os modelos matemáticos podem ser classificados como lineares ou não lineares nos parâmetros. Uma importante consequência da não linearidade de um modelo de regressão, é que os estimadores de

mínimos quadrados dos seus parâmetros não possuem as propriedades estatísticas desejáveis dos correlatos nos modelos de regressão linear.

Conforme RATKOWSKY (1983 a), os modelos não lineares podem ainda ser classificados em "próximo ao linear" ou "distante do linear", conforme as características estatísticas dos estimadores dos parâmetros.

Pelo fato de que a derivação de modelos físicos e biológicos frequentemente resultam de soluções de equações diferenciais, os modelos de regressão correspondentes são em geral não lineares. Entende-se por equações diferenciais aquelas que relacionam a variação da variável de resposta com a variação das variáveis independentes, com base na teoria da área envolvida.

Existem vários procedimentos numéricos iterativos para a 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 a).

A habilidade de obter a estimativa dos parâmetros de uma regressão não linear depende em parte, da estimativa inicial dos parâmetros. Para facilitar esta estimativa, os parâmetros devem ser interpretáveis. Métodos de regressão não paramétrica (HASTIE & TIBSHIRANI, 1990) podem ser utilizados com essa finalidade.

A adequação de pacotes estatísticos para ajustar funções não lineares deve ser sempre avaliada pois, em geral o erro da estimação dos parâmetros através do uso destes pacotes está associado com um número grande amostras, o que nem sempre é possível quando estamos trabalhando no campo da biologia e microbiologia. Como consequência, poderemos obter como resultado do ajuste, erros consideráveis dos estimadores dos parâmetros, sub-dimensionamento da variância real dos estimadores, e consequentemente um comprometimento da confiança no modelo (McMEEKIN et al., 1993).

2.1.3.4 - Validação

Independente do quanto um modelo se ajuste ao conjunto de dados que o geraram, o seu valor real está baseado no quão bem ele pode prever a variável de resposta sob condições não testadas especificamente para derivá-lo. Ou seja, o valor real de um modelo está baseado no quão bem ele trabalha no mundo real. Sendo assim, o último teste de qualquer modelo é avaliar sua habilidade em prever respostas a novas situações. Em microbiologia de alimentos, isto significa comparar os dados de comportamento de microrganismos de interesse, em alimentos submetidos a condições reais de estocagem e distribuição, com valores previstos pelo modelo ajustado (McMEEKIN et al., 1993).

Considerando as perspectivas de segurança e confiança do consumidor e a aceitação da indústria do conceito da microbiologia preditiva, o resultado de um modelo não validado neste nível, poderia ser sério e talvez levar a um descrédito do conceito (McMEEKIN et al., 1993). É fundamental que os modelos sejam validados antes de serem aplicados (WHITING & BUCHANAN, 1997).

Existem três formas básicas de validar um modelo de regressão, sendo (NETER et al., 1996 b):

- 1) Coleta de novos dados: Existe uma variedade de métodos para avaliar a validade de um modelo de regressão a partir de novos dados. Um desses métodos consiste em reestimar o modelo escolhido usando os novos dados e então avaliar a consistência dos coeficientes de regressão estimados e outras características do novo modelo ajustado com os do modelo baseado nos dados iniciais. Outro método consiste em reestimar, a partir dos novos dados, todos o "bons" modelos que foram originalmente considerados e verificar se o melhor modelo de regressão é ainda o modelo inicialmente selecionado. Um terceiro método de validação visa calibrar a capacidade preditiva do modelo de regressão selecionado, a partir do

cálculo do quadrado médio do erro de previsão, designado como MSPR ("mean squared prediction error").

$$\text{MSPR} = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n}$$

onde:

Y_i = valor da variável de resposta para o i -ésimo dado

\hat{Y}_i = valor da variável de resposta para o i -ésimo dado de validação baseado no modelo estabelecido

n = número de dados do conjunto de validação

Quando um modelo de regressão é desenvolvido para um determinado conjunto de dados, é inevitável que o modelo seja selecionado, pelo fato de se ajustar bem à este conjunto de dados. Como resultado, o valor do quadrado médio residual denominado de MSE tende a subestimar a variabilidade de uma previsão futura.

Quando o valor do MSPR, obtido a partir de novos dados (diferentes daqueles utilizados para derivar o modelo), for próximo ao valor do MSE, podemos inferir que o valor de MSE fornece uma indicação apropriada da capacidade preditiva do modelo.

- 2) Comparação de valores estimados com dados teóricos, resultados empíricos anteriores ou resultados de simulação: Comparações dos coeficientes de regressão e das previsões com dados teóricos, resultados empíricos anteriores ou resultados de simulação podem ser conduzidos. Infelizmente, em geral existe pouca teoria que possa ser aplicada para validar os modelos de regressão.
- 3) Validação cruzada ("cross-validation"): Divisão dos dados coletados para a derivação do modelo em dois conjuntos, sendo um deles utilizado para estabelecer o modelo de regressão e o outro para validar esse modelo. Apesar do método de validação a partir da coleta de novos dados ser o melhor, o método de validação cruzada é especialmente importante quando a coleta de novos dados não é prática e/ou possível. É importante salientar que uma vez validado o

modelo é uma prática usual utilizar a totalidade dos dados para se estimar o modelo de regressão final.

2.1.3.5 - Manutenção

DRAPER & SMITH (1981) indicam que uma vez que o modelo tenha sido validado e implantado na prática, é ainda necessário se definir um procedimento para manter o modelo e reconhecer quando ele está se tornando obsoleto.

Esses autores recomendam que, para avaliações rotineiras, quadros de controle da qualidade são adequados, mas que o modelo deve também ser avaliado periodicamente por um estatístico, que poderá definir formas mais sensíveis de detecção de desvio.

2.1.4 - Níveis dos modelos

A microbiologia preditiva tem sido considerada sob dois aspectos, sendo: o probabilístico e o cinético, gerando os modelos probabilísticos e cinéticos, respectivamente (ROSS & McMEEKIN, 1994).

Estes modelos podem ainda ser do tipo empírico ou mecanístico (determinístico). Os modelos empíricos simplesmente descrevem um conjunto de dados através de uma relação matemática conveniente, enquanto que os modelos mecanísticos, fornecem a interpretação dos parâmetros do modelo em termos de fenômenos e processos conhecidos (MCMEEKIN et al., 1993).

Os modelos probabilísticos correspondem à construção de modelos para prever a probabilidade de algum evento, como por exemplo, a germinação de esporos ou a formação de uma quantidade de toxina detectável, em um determinado período de tempo. Amostras em replicata de um inóculo conhecido são incubadas por um período fixo de tempo, sob condições ambientais definidas e a proporção de replicatas positivas para o crescimento / produção de toxina é então analisada. Como esta proporção é dependente de condições ambientais específicas, um

modelo descrevendo a probabilidade para estas condições pode ser definido.

Os modelos cinéticos correspondem à modelagem da extensão e velocidade de crescimento ou destruição de microrganismos de interesse.

A tradicional distinção entre os modelos cinéticos e probabilísticos é, no entanto, artificial. Devemos interpretar a forma sigmóide da curva de probabilidade como uma reflexão da variação da velocidade de crescimento e do tempo de duração da fase lag; velocidades mais rápidas resultando em detecção de crescimento mais cedo. Os dois tipos de modelos devem ser considerados como sendo os extremos de um espectro das necessidades da modelagem, e pesquisas nestes extremos estão agora se convergindo. Próximo a condições limites de crescimento, os modelos cinéticos devem considerar a probabilidade de uma velocidade de crescimento prevista, ou até mesmo o crescimento. Da mesma forma, os modelos probabilísticos devem incluir algumas considerações cinéticas. Em uma situação onde nenhum crescimento do microrganismo de interesse é tolerável, deve-se utilizar um modelo probabilístico para assegurar que a chance de resolução da fase lag ou germinação dos esporos seja insignificamente baixa. No outro extremo, em que um produto é manipulado sob condições nas quais a probabilidade de crescimento de organismos deteriorantes é igual a um, necessita-se apenas da estimativa da velocidade de crescimento para se prever o "shelf life" (ROSS & McMEEKIN, 1994).

Pode-se considerar que os modelos matemáticos estabelecidos para a microbiologia preditiva possuem três níveis: nível primário ou primeiro nível, nível secundário ou segundo nível e nível terciário ou terceiro nível (WHITING & BUCHANAN, 1993). Para se obter a previsão ou estimativa da segurança e qualidade de um alimento, o processo de modelagem é revertido, ou seja, os valores dos fatores ambientais de interesse são introduzidos no modelo secundário para se obter valores específicos para o modelo primário. O modelo primário é então resolvido

através do incremento no tempo para se obter a curva de crescimento ou destruição esperada para aquela combinação de valores dos fatores ambientais (WHITING & BUCHANAN, 1997).

2.1.4.1 - Nível primário

O nível primário corresponde a modelos matemáticos que descrevem a mudança do número de microrganismos em função do tempo. Um exemplo é um modelo que descreve a redução da contagem de Unidades Formadoras de Colônia durante um processamento térmico. A formação de uma toxina microbiana ou outro metabólito com o tempo, pode representar um outro tipo de modelo de nível primário (WHITING & BUCHANAN, 1997). O modelo mais utilizado para descrever essas curvas é o de Gompertz (equação 1) modificado por GIBSON et al. (1987) (equação 2). Trata-se de uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica (WHITING & BUCHANAN, 1997).

A equação original de Gompertz (equação 1) não considera a fase lag, como é o caso da sua forma modificada, mas apenas o aumento da densidade de células uma vez iniciado o crescimento exponencial (MCMEEKIN, et al., 1993).

A equação original de Gompertz é assim descrita:

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

Onde:

t = tempo

$N_{(t)}$ = densidade da população no tempo t

C = valor da assíntota superior, isto é, a densidade máxima da população indicado por $N_{(+\infty)}$

M = tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima

B = velocidade de crescimento relativa no tempo M

A equação de Gompertz modificada pode ser assim representada:

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

Segundo McMEEKIN et al. (1993) e BUCHANAN (1993):

$N_{(t)}$ e t têm o mesmo significado da equação 1

A = valor da assíntota inferior, isto é, $\log N_{(-\infty)}$ (aproximadamente equivalente ao log do número inicial de bactérias)

C = valor da assíntota superior, isto é, $\log N_{(+\infty)}$ (aproximadamente equivalente ao log da densidade máxima da população durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial)

M = tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima

B = velocidade de crescimento relativa no tempo M

Apesar de existir uma grande variedade de curvas sigmóides, o modelo de Gompertz modificado é o que fornece melhores ajustes aos dados relacionados com a microbiologia (WHITING & BUCHANAN, 1997). Em uma primeira análise, essa equação parece complexa. No entanto, os quatro parâmetros da equação podem prontamente ser relacionados matematicamente com características culturais familiares aos microbiologistas (Figura 3) (BUCHANAN, 1993 b).

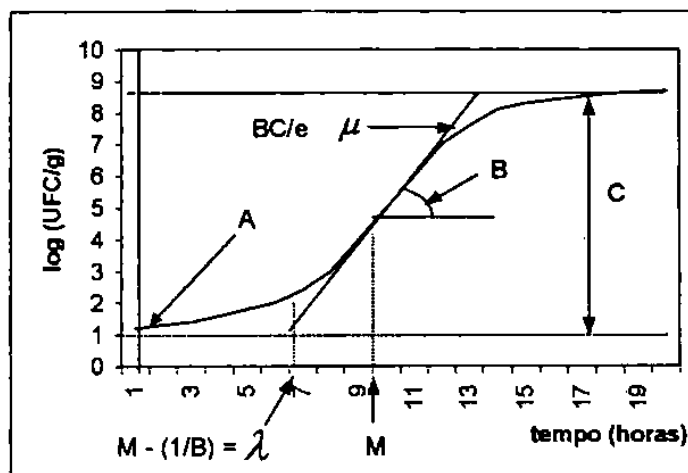


Figura 3: Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada (BUCHANAN, 1993 b).

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

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

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

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

Onde:

μ = velocidade de crescimento exponencial {[log (UFC/g)]/h}

GT = tempo de geração (h)

λ = duração da fase lag (h)

MPD = log da densidade máxima da população [log(UFC/g)]

A duração da fase lag é melhor calculada pela expressão (McMEEKIN et al., 1993):

$$\lambda = M - (1/B) + (\log N_0 - A) / (BC/e) \quad (7)$$

Quando A é igual log N_0 , então a equação (7) é reduzida para a equação (5). O uso da equação (7) elimina o problema de previsão de valores negativos de duração da fase lag usando a equação (5), quando A é diferente de log N_0 .

A equação de Gompertz modificada (equação 2) é utilizada nos programas Food MicroModel, do Reino Unido e Pathogen Modeling Program, dos Estados Unidos. Apesar da sua vasta utilização, a equação de Gompertz modificada possui inúmeras falhas. A fase lag não é estritamente paralela ao eixo das abcissas e a assíntota matemática (número de células no inócuo) está fora da escala em tempo negativo. A equação não apresenta um período de aumento linear (log UFC/ml) durante a fase de crescimento exponencial, como é observado com a maioria das curvas de crescimento. Assim sendo, como a velocidade de crescimento exponencial é determinada por um

ponto de inflexão na curva, o processo de ajuste tende a fornecer valores que são um pouco mais variáveis do que as velocidades de crescimento correspondentes, determinadas por um período de crescimento linear (WHITING & BUCHANAN, 1997).

Para solucionar estes problemas e fornecer uma base mais mecanística ou biológica, o modelo proposto por BARANYI & ROBERTS (1994) inclui uma fase de crescimento exponencial linear, $\mu(x)$, a qual está relacionada com a velocidade de crescimento exponencial máxima ($\mu_{\text{máx}}$), e uma fase lag determinada por uma função de ajuste, $\alpha(t)$.

A equação de Gompertz modificada, incluindo estes elementos passa a ser (WHITING & BUCHANAN, 1997):

$$\text{Log}N(t) = A + \mu_{\text{máx}} A_{(t)} - \ln \left\{ 1 + \left[\frac{e^{\mu_{\text{máx}} \alpha(t)} - 1}{e^{(C - A)}} \right] \right\} \quad (8)$$

Onde:

$N_{(t)}$ e t têm o mesmo significado da equação 1

A = valor da assíntota inferior, isto é, $\log N_{(-\infty)}$

C = valor da assíntota superior, isto é, $\log N_{(+\infty)}$

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidade de crescimento exponencial máxima

$A_{(t)}$ = integral da função de ajuste, $\alpha(t)$

Um importante conceito apresentado por este modelo é que a fase lag observada é uma combinação do estado fisiológico das células (q_0) e da adaptação ao novo ambiente (v).

A fase lag (λ) considerando os valores de (q_0) e (v) é calcula pela seguinte equação:

$$\lambda = \ln (1 + 1/q_0) / v \quad (9)$$

Se as células não estão prontas para crescer (q_0 pequeno) ou a adaptação é lenta (v pequeno), a fase lag será estendida.

2.1.4.2 - Nível secundário

O nível secundário envolve equações que descrevem como as características das curvas de crescimento, obtidas através dos modelos primários (duração da fase lag, velocidade de crescimento e densidade máxima de população) mudam com alterações nos fatores ambientais. Estas equações podem ser baseadas nas equações de Arrhenius e de Bélerádek (modelo da raiz quadrada) (McMEEKIN et al., 1993; SKINNER et al., 1994) , se um grupo específico de alimentos está sendo modelado, particularmente se a temperatura for o fator primário de interesse, como é frequentemente o caso.

A equação de Arrhenius assume que a velocidade de crescimento é controlada pela velocidade limite de uma única reação enzimática. O modelo de Bélerádek está baseado na relação linear que existe entre a raiz quadrada da velocidade de crescimento abaixo da velocidade de crescimento ótima e a temperatura. Estes modelos ainda assumem que cada fator ambiental é independente, 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 independente, neste caso, a equação representa o melhor ajuste a um conjunto de dados em particular. Quanto mais complexa a equação, com interações e termos quadráticos e cúbicos, mais flexível a superfície multidimensional e melhor o ajuste da equação aos dados de origem (WHITING & BUCHANAN, 1997).

A equação de Arrhenius é dada por:

$$\ln k = \ln A - E_a/RT \quad (10)$$

Onde:

k = velocidade de crescimento

A = parâmetro a ser ajustado

E_a = energia de ativação da reação que limita a velocidade de crescimento, ou simplesmente a temperatura característica

R = constante universal dos gases (8.314 J / K mol)

T = temperatura em Kelvin

A equação de Béléradek é dada por.

$$k^{1/2} = b (T - T_{min}) \quad (11)$$

Onde:

k = velocidade de crescimento

b = parâmetro a ser estimado

T = temperatura de interesse (temperaturas subótimas)

T_{min} = temperatura mínima em que a velocidade de crescimento extrapolada é zero

2.1.4.3 - Nível terciário

Programas (softwares) utilizados para resolver os modelos de nível primário e secundário, constituem no nível terciário.

Os programas "Food MicroModel" (Leatherhead Food Research Association, Surrey, U.K) e o "Pathogen Modeling Program " (U.S. Department of Agriculture, Wyndmoor, Pa, UDA) são exemplos do nível terciário dos modelos. Estes programas incluem modelos definidos a partir de condições constantes do meio ambiente (WHITING & BUCHANAN, 1997).

2.1.5 - Comparação de modelos (McMEEKIN et al., 1993; RATKOWSKY, 1993 b)

Para se comparar os modelos preditivos, deve-se considerar 7 critérios básicos:

-Ajuste da função aos dados ("goodness-of-fit"): este critério fornece informações quanto à capacidade de um determinado modelo, em

descrever o comportamento de microrganismos de interesse em situações reais, conforme já discutido no item 2.1.3.4.

- Parcimônia: quanto maior o número de parâmetros em um modelo de regressão não linear, maior a extensão de seu comportamento não linear ou seja, as características estatísticas dos estimadores dos parâmetros estarão mais distante das características desejáveis. Se dois modelos se ajustam a um conjunto de dados igualmente, e um possui dois parâmetros e o outro quatro parâmetros, então certamente o modelo com dois parâmetros deve ser o de escolha.

- Propriedades dos estimadores dos parâmetros: é raro um modelo não linear, com dois ou mais parâmetros, ser próximo ao linear em sua parameterização original. Sendo assim, a reparameterização, que significa alterar a forma na qual os parâmetros aparecem no modelo, é uma maneira de melhorar as propriedades dos estimadores de um modelo e torná-las próximas à de um modelo linear.

O fato de um modelo ajustar-se bem aos dados coletados, não garante que as propriedades estatísticas dos estimadores sejam adequadas.

- Faixa de aplicação: uma das maiores causas da estimação "pobre" de um modelo é o fato de que algumas vezes o ajuste é realizado quando apenas parte dos dados está disponível. Por esta razão deve-se utilizar uma faixa de variação das variáveis independentes o mais completa possível, para obter uma faixa de variação da resposta o mais completa possível, ou seja, é importante que o conjunto de dados ao qual o modelo está ajustado abranja toda a faixa em que o modelo se aplica.

Conforme já comentado no item 2.1.3.1, em geral é considerado imprudente estimar respostas além da faixa de variação dos dados usados para gerar o modelo a ser utilizado, ou seja, a extrapolação.

- Especificação estocástica: é importante que o comportamento dos erros seja investigado e especificado corretamente, pois conforme já discutido no item 2.1.3.1 o método a ser utilizado para o ajuste dos parâmetros depende do comportamento dos erros.

- Interpretabilidade dos parâmetros: do ponto de vista prático, parâmetros interpretáveis frequentemente conduzem a melhores estimativas iniciais e conseqüentemente podem simplificar o processo de ajuste de um modelo não linear.

A interpretabilidade de um parâmetro de um modelo não linear, não é garantia de que as propriedades dos estimadores estejam próximas às de um modelo linear.

- Facilidade de uso: ao se avaliar a facilidade de uso de um modelo deve-se considerar: a facilidade em se compreender como o modelo trabalha, a quantidade e complexidade dos dados necessários para processar o modelo e os requisitos de software e hardware necessários. Este critério deve ser utilizado como base para seleção de um modelo, apenas quando os demais critérios falharem em fornecer diferenças entre os modelos comparados.

2.1.6 - Problemas potenciais e soluções

A aplicação prática da interpretação do histórico de temperatura de um produto em termos de potencial de crescimento microbiano (integração da função temperatura) apresenta três problemas (GILL, 1986).

O primeiro problema está relacionado com a dependência das previsões (por exemplo: tempo para deterioração e tempo para atingir um limite legal), em relação ao número de microrganismos inicialmente presente no produto. Duas estratégias podem ser adotadas para solucionar este problema. Uma delas é o uso de um método rápido para

determinar a carga microbiana inicial. No entanto, não existe até o momento, um método suficientemente rápido ou efetivo em termos de custo. A segunda estratégia é basear as previsões em um inóculo inicial pré-estabelecido. O valor escolhido deve estar baseado sobre o que é possível se atingir aplicando GMP ("Good Manufacturing Practices"), ou, em circunstâncias menos controladas, sobre a pior situação (ROSS & McMEEKIN, 1994).

O segundo problema refere-se à identificação do modelo matemático adequado para relacionar o crescimento bacteriano e a temperatura, e que facilite a integração.

O terceiro problema refer-se a complexidade, heterogeneidade e incompleta compreensão do sistema bactéria / alimento. O problema da heterogeneidade foi considerado por GILL et al (1991 a, b) e solucionado pela aplicação da estratégia do "pior caso", isto é, considerar a parte do alimento em questão que mais favorece o crescimento dos microrganismos em estudo.

A complexidade do sistema bactéria / alimento está relacionada com as interações microbianas e com os efeitos diferenciados das temperaturas sobre os componentes da microbiota inicial, conforme previsto por SCOTT (1937). Quanto às interações microbianas, existem evidências que sugerem que os microrganismos não apresentam uma grande influência no crescimento de outros microrganismos, exceto quando a densidade da população é muito elevada. Do ponto de vista das previsões de interesse na microbiologia de alimentos, estas densidades elevadas ocorrem apenas após se atingir a deterioração, toxigênese ou níveis de dose infecciosa. Isto sugere que para muitas aplicações, o efeito do histórico do meio ambiente sobre cada componente da microbiota, deve ser modelado e calculado de forma independente, sem a necessidade de considerar interações. Exceções devem ser consideradas, como é o caso de cepas de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocinas (ROSS & McMEEKIN, 1994).

A aplicabilidade de modelos derivados de experimentos em condições estáticas, para situações de condições dinâmicas ou flutuantes é um outro fator apontado como um problema potencial para a aplicação da microbiologia preditiva. No entanto, muitos artigos baseados em vários produtos, indicam ser esta situação possível (ROSS & McMEEKIN, 1994).

WHITING (1997) destaca ainda que, para fornecer aos usuários uma idéia melhor das previsões dos modelos quanto à adequação da sua precisão e capacidade de refletir a realidade, é necessário se definir o limite de confiança das previsões. Como consequência, os modelos existentes estão sendo recalculados para incorporar essa informação. Observa-se contudo, que fatores que controlam a fase lag, e que portanto, podem comprometer os limites de confiança das previsões, necessitam de mais pesquisa. Novos modelos de crescimento como o de BARANYI & ROBERTS (1994), citado no item 2.1.4.1, que incorporam os efeitos da fase lag e a flutuação ou variação das condições do meio ambiente (por exemplo: temperatura) estão sendo desenvolvidos.

2.1.7 – Perspectivas

O seticismo quanto à aplicabilidade de modelos derivados de um sistema experimental para prever o crescimento microbiano em alimentos foi destacado e contestado por ROSS & McMEEKIN (1994), ao citarem os inúmeros trabalhos publicados na literatura de modelagem cinética, particularmente os trabalhos de GIBSON et al. (1988) e WIJTZES et al. (1993).

As vantagens potenciais da microbiologia preditiva são inúmeras (COLE, 1991). Apesar de alguns sistemas de modelagem preditiva já estarem disponíveis comercialmente, a completa utilização deste potencial depende da obtenção e modelagem dos dados de maneira consciente e rigorosa. Depende também de soluções e estratégias

engenhosas para a aplicação dos dados e modelos, e do desejo por parte da indústria de alimentos de aplicar a microbiologia preditiva (ROSS & McMEEKIN, 1994).

Apesar do cenário favorável à aplicação da microbiologia preditiva, os modelos de crescimento de patógenos não respondem a questão: "Este alimento ou processo é seguro?" ou "Comendo este alimento eu ficarei doente?". Os modelos precisam ser incorporados em um Sistema de Análise de Risco ("Risk Assessment") que inclui a distribuição dos patógenos na matéria-prima, mudanças na população de patógenos durante o processamento, distribuição, e preparo do alimento, e dados de dose infecciosa (WHITING, 1997).

2.2 - Deterioração de salsichas

2.2.1 – Introdução

A salsicha é um produto cárneo que faz parte do grupo dos embutidos. Em inglês os embutidos são chamados de "sausages", do latim "salsus" (sal), que significa carne moída ou picada preservada pela adição de sal. Existem centenas de produtos embutidos disponíveis aos consumidores. Atualmente, os embutidos são consumidos devido: (1) a conveniência, (2) a variedade, (3) a economia, e (4) valor nutricional. Os produtos embutidos exigem um pequeno tempo de preparo, com alguns embutidos estando prontos para servir e outros necessitando apenas serem aquecidos.

Os embutidos são econômicos pois, normalmente são fabricados a partir de cortes baratos de carne ou de produtos secundários. Os embutidos apresentam um bom valor nutricional pois, a maioria deles contém significantes quantidades de proteínas de alta qualidade e são boas fontes de muitos minerais essenciais, incluindo o ferro e o zinco,

assim como vitaminas do complexo B, incluindo o ácido fólico e a vitamina B₆ e B₁₂.

O termo "embutido" engloba tantos produtos, que não existe um sistema único de classificação que seja completamente satisfatório. Alguns dos sistemas de classificação mais comuns são os seguintes:

1. quanto ao grau de trituração

- a. moído grosseiramente
- b. emulsão ou triturado finamente

2. quanto ao cozimento

- a. não cozido
- b. cozido

3. quanto a defumação

- a. não defumado
- b. defumado

4. quanto a quantidade de água adicionada

- a. sem adição de água
- b. com adição de água

5. quanto a cura

- a. não curado (fresco)
- b. curado

6. quanto a fermentação

- a. não fermentado
- b. fermentado

7. quanto a quantidade de umidade no produto final

Os embutidos atualmente produzidos frequentemente podem ser classificados em dois ou mais dos sistemas citados (PEARSON & TAUBER, 1984).

No Brasil, a definição de salsicha, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, Mortadela, Linguiça e Salsicha, do Ministério da Agricultura e

Abastecimento, conforme Instrução Normativa nº 4 de 31/03/2000, publicada no Diário Oficial da União de 05/04/2000, é a seguinte:

Entende-se por salsicha, o produto cárneo industrializado obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies animais de açougue, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural, ou artificial ou por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado.

Ainda segundo o Regulamento Técnico citado, a classificação das salsichas, pode ser a seguinte, conforme a composição da matéria-prima e as técnicas de fabricação utilizadas:

-Salsicha: Carnes de diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separadas, até o limite máximo de 60%, miúdos comestíveis de diferentes espécies animais de açougue (estômago, coração, língua, rins, miolos, fígado), tendões, pele e gorduras.

-Salsicha tipo Viena: Carnes bovina e/ou suína e carnes mecanicamente separadas até o limite máximo de 40%, miúdos comestíveis de bovino e/ou suíno (estômago, coração, língua, rins, miolos, fígado), tendões, pele e gorduras.

-Salsicha tipo Frankfurt: Carnes bovina e/ou suína e carnes mecanicamente separadas até o limite máximo de 40%, miúdos comestíveis de bovino e/ou suíno (estômago, coração, língua, rins, miolos, fígado), tendões, pele e gorduras.

-Salsicha Viena: Porções musculares de carnes bovina e/ou suína e gorduras.

-Salsicha Frankfurt: Porções musculares de carnes bovina e/ou suína e gorduras.

-Salsicha de Carne de Ave: Carne de ave e carne mecanicamente separada de ave, no máximo de 40%, miúdos comestíveis e gorduras.

2.2.2 - Processamento tecnológico (PARDI et al., 1994)

As pastas empregadas na elaboração de salsichas não constituem uma emulsão verdadeira, no entanto, são tão assemelhadas a tal que os fabricantes de salsicha normalmente se referem a esta "pasta" como sendo uma emulsão (KRAMLICH, 1971). A fase dispersa é constituída pela gordura, a fase contínua pela água e as proteínas solúveis da carne, (em especial a actina e a miosina) extraídas durante a passagem pelo cutter e pela ação da salmoura. Estas proteínas solúveis atuam como elementos emulsionantes.

A elaboração da salsicha, quando a carne consta de blocos congelados, começa pelo fatiamento e trituração grosseira destes blocos, seguido da cominuição no cutter e depois no emulsionador, também chamado moinho colóide. Devido ao calor gerado durante estas operações mecânicas, é necessário o resfriamento da massa através do abaixamento da temperatura com a adição de gelo em escama. O gelo funciona melhor do que a água gelada devido ao calor de fusão latente adicional que ele absorverá durante a fusão. É necessário o controle microbiológico do gelo utilizado. Quando no cutter, são adicionados os aditivos e condimentos em geral, do que resulta uma mistura homogênea. Para uma maior homogeneidade, o sal, o nitrito, e o açúcar devem ser previamente diluídos em água. A gordura adicionada aos embutidos é previamente emulsionada pois, caso contrário, pode ocorrer durante a cocção, uma separação dessa massa, depreciando o produto.

Preparada a massa, é feito o embutimento nas chamadas ensacadeiras. O embutido em tripas artificiais é feito em amarradeiras que, por vezes, apenas retorcem, operando de modo contínuo. Em geral quando a massa é embutida em tripa natural, a amarração é feita manualmente devido a fragilidade da tripa de carneiro.

Uma vez embutida a massa, o processo seguinte é o de cozimento em estufas aquecidas eletricamente e com controle eletrônico, ou a vapor. Inicialmente, o produto é submetido a uma temperatura de

aproximadamente 40°C por cerca de uma hora, e gradualmente atinge cerca de 80°C na estufa e em torno de 70 a 75°C no interior das salsichas nas duas horas seguintes. A operação de defumação, se desejada, é feita simultaneamente ao cozimento.

Após o cozimento, os gomos de salsicha passam por um banho de chuveiro ou de imersão em água inicialmente a temperatura ambiente e depois gelada, afim de permitir a operação denominada de descascamento ou depelagem, que consiste na retirada dos envoltórios plásticos.

As salsichas em gomos isolados podem também ser tratadas por corantes permitidos, via de regra a base de urucum, por imersão diretamente em um banho contendo o corante diluído.

A etapa final é o empacotamento em sistema cry-o-vac ou similar.

Prática proibida, mas às vezes observada, é o reprocessamento das salsichas defeituosas, quando o corante passa a fazer parte da massa.

2.2.3 - Contaminação da matéria-prima (JUDGE et al., 1989)

Com exceção das superfícies externas (pele e cabelo), trato gastrointestinal e respiratório, os tecidos dos animais vivos são livres de microrganismos. As células brancas do sangue e os anticorpos controlam efetivamente agentes infecciosos no corpo do animal vivo. Estes mecanismos de defesa interna, no entanto, são perdidos quando da sangria do animal. Sendo assim, imediatamente após a etapa de remoção do sangue e as etapas subsequentes, medidas devem ser adotadas para minimizar a contaminação e crescimento microbiano.

A contaminação inicial da carne pode ser resultado da introdução de microrganismos no sistema vascular quando facas não esterilizadas são utilizadas na sangria. Como o sangue continua a circular por um curto espaço de tempo após o corte para a sangria, os microrganismos introduzidos se disseminam pelo corpo do animal.

Após esta etapa a contaminação ocorre pela introdução de microrganismos na superfície da carne em quase todas as operações executadas no abate, corte, processamento, estocagem, e distribuição da carne. Esta contaminação pode ser decorrente do contato com a pele, pés, extrume e vísceras (se elas forem perfuradas) durante o abate. Outras fontes potenciais de contaminação microbiana incluem equipamentos, roupa e as mãos do pessoal operacional, ar, água, paredes e portas.

A higienização adequada da área de produção certamente limita a contaminação microbiana. Ou seja, falha no processo de higienização normalmente aumenta a velocidade e extensão da deterioração.

Portanto, após o abate, a superfície das carcaças normalmente possui altas proporções de bactérias de origem fecal e do solo. Durante a estocagem refrigerada estas bactérias usualmente são superadas em número pelas bactérias psicrófilas e psicrotrófilas (BANWART, 1989). Entre os gêneros importantes encontrados na carne durante a estocagem refrigerada são: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Flavobacterium* e *Proteus*. Algumas espécies desses psicrófilos podem crescer, apesar de muito lentamente, a temperaturas de congelamento. Enquanto o congelamento destrói ou danifica muitas bactérias presentes na carne, e o número de organismos continua a diminuir durante a estocagem sob congelamento, espécies dos gêneros citados sobrevivem e reduzem o crescimento até o descongelamento.

2.2.4 - Deterioração de origem microbiana

As carnes e produtos cárneos são extremamente perecíveis, sendo assim necessário um cuidado e manuseio especial durante todas as operações relacionadas com a produção. A deterioração da carne começa logo após a sangria do animal como resultado de processos microbiológicos, químicos e físicos.

Em condições de manuseio e estocagem adequados, a principal preocupação quanto a deterioração da carne e produtos cárneos é a contaminação e atividade microbiológica, visto que a atividade dos microrganismos contaminantes raramente pode ser completamente reduzida, sejam quais forem as medidas de controle aplicadas (JUDGE et al., 1989).

A flora microbiana de um alimento, consiste de microrganismos associados com a matéria-prima, aqueles adquiridos durante o manuseio e processamento, e aqueles que sobreviveram ao tratamento de preservação e estocagem. As fontes potenciais de contaminação são o solo, a água, o ar, as plantas, a ração ou fertilizantes, os animais, os seres humanos, os dejetos, os equipamentos de processamento, os ingredientes, os próprios produtos e materiais de embalagem (JUDGE et al., 1989).

Elevadas contagens de bactérias ácido lácticas (lactobacilos homofermentativos e leuconostocs) têm sido associadas com a deterioração de salsichas tipo Viena defumada, embalada a vácuo (HOLY et al., 1991).

MAKELA et al (1990) demonstraram que a matéria-prima de embutidos cozidos é uma importante fonte das bactérias ácido lácticas presentes nesse tipo de produto deteriorado.

A recontaminação de produtos cárneos cozidos por bactérias ácido lácticas durante o manuseio pós processamento térmico, tem sido relatada. A área de processamento e os equipamentos, do quais foram isoladas bactérias ácido lácticas foram consideradas uma das fontes dessa recontaminação (MAKELA & KORKEALA, 1987).

As principais formas de conservação das salsichas são o processamento térmico (cozimento) e o armazenamento sob refrigeração (WURLITZER & AMBIEL, 1999). Considera-se como temperatura de refrigeração a faixa de 0°C a 7°C (JAY, 1992). Portanto, tal como para qualquer outro alimento refrigerado, os principais microrganismos envolvidos no processo de deterioração são os psicrófilos (temperatura

ótima de crescimento de 15°C ou mais baixa e máxima temperatura de crescimento abaixo de 20°C (BROCK et al., 1994). Alguns microrganismos mesófilos são psicotrófilos e podem crescer em alimentos refrigerados, contudo, a temperatura ótima de crescimento destes microrganismos é de 25°C a 30°C, e portanto o crescimento é reduzido sob refrigeração (BANWART, 1989). A utilização da embalagem à vácuo é um fator que também contribui para controlar o crescimento de microrganismos nas salsichas. O uso da embalagem à vácuo favorece a deterioração principalmente por bactérias ácido lácticas e *Brochothrix thermosphacta* (ICMSF, 1998).

Em embutidos inteiros, o "enchimento" é protegido pelo envoltório e somente bactérias que sobreviveram ao cozimento estão envolvidas com a deterioração interna do produto (VARNAM & SUTHERLAND, 1995). A sobrevivência de células vegetativas após o processamento térmico de embutidos cozidos é raro, no entanto, *Enterococcus* e cepas termo-resistentes de *Lactobacillus* podem ocasionalmente sobreviver, principalmente no caso de processamento marginal de embutidos de maior diâmetro (VARNAM & SUTHERLAND, 1995; ICMSF, 1998). O potencial deteriorante destas bactérias, no entanto, é baixo. O padrão de deterioração mais comum envolve a produção de ácido e leves odores desagradáveis, apesar de poder ocorrer a produção de gases por cepas de *Lactobacillus* heterofermentativos. A deterioração mais impressionante, frequentemente associada a contaminação pós-processamento, ocorre quando cepas de *Lactobacillus* produtoras de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) estão presentes. O peróxido de hidrogênio, produzido durante o crescimento aeróbio, na ausência da catalase (que é inativada durante o cozimento), oxida o pigmento, nitrosomioglobina denaturada resultando em uma coloração cinza esverdeada ou, menos frequentemente uma coloração amarela ou branca. O peróxido de hidrogênio não é produzido na ausência de oxigênio, e em alguns casos os clássicos anéis esverdeados são observados, indicando a difusão interna do oxigênio. Qualquer microrganismo do grupo das bactérias

ácido lácticas podem produzir o peróxido de hidrogênio, mas esta propriedade é mais frequentemente associada com *Enterococcus*, *Lactobacillus viridescens* e *Pediococcus*. A fonte original das bactérias ácido lácticas produtoras de peróxido de hidrogênio é frequentemente associada com embutidos fermentados, manipulados na mesma linha de embalagem. Parece ser provável que ocorra a colonização da planta fabril.

A germinação de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* pode ocorrer, especialmente em embutidos contendo baixo conteúdo de nitrito. Na prática, contudo, este usualmente só é um problema quando o produto é submetido a um grande abuso de temperatura. A deterioração frequentemente envolve uma grande produção de gás com a ruptura do conteúdo e o estufamento do envoltório ou da embalagem. A produção de gás pode ser acompanhada de produção de ácido e/ou, especialmente no caso de *Clostridium*, odor desagradável. Em alguns casos, o crescimento de *Clostridium* resulta em uma massa de cor preta. Este fenômeno parece estar relacionado com a produção de sulfito de hidrogênio, mas o mecanismo não está totalmente elucidado (VARNAM & SUTHERLAND, 1995).

Os microrganismos também atuam degradando as proteínas, lipídios, carboidratos e outras moléculas complexas em outras mais simples, acompanhando a ação de enzimas hidrolíticas endógenas da própria matéria-prima. Inicialmente as enzimas endógenas são as responsáveis pela degradação das moléculas complexas, mas a medida que o número de microrganismos e suas atividades aumentam, eles contribuem para, e eventualmente determinam quase todas as reações de degradação subsequentes.

Os microrganismos preferem os carboidratos do que outros componentes como fonte de energia, utilizando-os prontamente quando disponíveis. A utilização dos carboidratos, adicionados a emulsão da salsicha e em outros produtos industrializados, pelos microrganismos,

resulta em uma variedade de produtos finais incluindo álcoois e ácidos orgânicos

Os produtos finais da ação microbiana sobre as proteínas dependem da disponibilidade de oxigênio. Quando há disponibilidade de oxigênio, as proteínas são hidrolizadas e transformadas em peptídios simples e aminoácidos. Em condição de anaerobiose, as proteínas são degradadas a uma variedade de compostos contendo enxofre, todos com odor e em geral desagradável. Produtos finais de compostos não proteicos contendo nitrogênio, em geral contêm amônia, que tem um odor característico (JUDGE et al., 1989).

2.2.4.1 - Bactérias ácido lácticas (BROCK et al., 1994)

As bactérias lácticas são caracterizadas como sendo bactérias Gram-positivas, em geral não móveis e não esporuladas, que produzem ácido láctico como o principal ou único produto do metabolismo fermentativo.

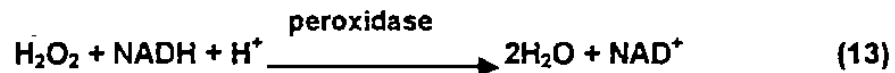
O processo de fermentação pode ser definido como sendo um conjunto de reações de óxido-redução balanceadas dos compostos orgânicos com liberação de energia, realizadas por microrganismos na ausência de fornecimento externo de aceptores de elétron. O ATP é produzido nas fermentações através da **fosforilação a nível de substrato**. Na fosforilação a nível de substrato, o ATP é sintetizado durante etapas enzimáticas específicas do catabolismo dos compostos orgânicos, ao contrário da fosforilação oxidativa (ou transporte de elétron), onde o ATP é produzido através de eventos mediados pela membrana citoplasmática e não relacionados diretamente com o metabolismo de substratos específicos.

O crescimento de bactérias ácido lácticas é favorecido por fatores tais como a baixa temperatura de estocagem, presença de nitrito e sais de cura, e condições microaerófilas (DAVIES et al., 1999).

Todas as bactérias ácido lácticas crescem anaerobicamente. Ao contrário de muitos anaeróbios, contudo, a maioria das bactérias lácticas

não são sensíveis ao O_2 e podem crescer na sua presença assim como na sua ausência; portanto elas são **bactérias anaeróbias aerotolerantes**. Algumas cepas são capazes de aproveitar o O_2 através da mediação dos sistemas de flavoproteína oxidase, produzindo o H_2O_2 , apesar de muitas cepas serem deficientes em catalase e muitas dispõem do H_2O_2 via enzimas alternativas denominadas de peroxidases.

A catalase é uma das enzimas mais comuns que atuam na destruição de derivados tóxicos do oxigênio, mais precisamente sobre o ânion peróxido (O_2^{2-}) mais conhecido na forma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A peroxidase também age sobre o peróxido de hidrogênio, no entanto, ela requer a presença de um redutor, normalmente o NADH. A atividade de cada uma das enzimas é ilustrada nas equações 12 e 13, respectivamente.



Nenhum ATP é formado na reação envolvendo a flavoproteína oxidase, mas o sistema oxidase pode ser usado para reoxidar o NADH formado durante a fermentação.

Muitas das bactérias ácido lácticas podem obter energia apenas a partir do metabolismo de açúcares e compostos fermentáveis relacionados, e portanto estão normalmente restritas a habitats onde o açúcar está presente. Elas normalmente possuem uma limitada habilidade biossintética, e suas necessidades nutricionais complexas incluem a necessidade de aminoácidos, vitaminas, purinas, e pirimidinas.

Tradicionalmente, as bactérias ácido lácticas eram consideradas como sendo um único grupo englobando tanto cocos como bastonetes.

Alguns pesquisadores preferem separar o grupo. Uma importante diferença entre os subgrupos está relacionada com os produtos formados durante a fermentação dos açúcares. O grupo denominado **homofermentativo**, produz basicamente um único produto de fermentação, o ácido láctico, enquanto que o outro grupo, denominado **heterofermentativo**, produz outros produtos, principalmente o etanol e o CO_2 , assim como o lactato.

Os heterofermentadores produzem apenas 1 mol de ATP a partir de 1 molécula de glicose enquanto que 2 moles são produzidos pelos homofermentadores. Esta diferença no rendimento de ATP a partir da glicose reflete no fato de que os homofermentadores produzem duas vezes mais massa celular do que os heterofermentadores a partir da mesma quantidade de glicose. Devido ao fato de que os heterofermentadores descarboxilam o 6-fosfogluconato, eles produzem CO_2 como um produto de fermentação, enquanto que os homofermentadores produzem pouco ou nenhum CO_2 ; portanto uma maneira simples de detectar um heterofermentador é observar a produção de CO_2 em culturas de laboratório. Em termos enzimáticos, os heterofermentadores são caracterizados pela ausência da enzima aldolase e presença da fosfoacetolase.

Os vários gêneros de bactérias ácido lácticas têm sido definidos baseado na morfologia, composição das bases do DNA e tipo de metabolismo fermentativo. Os principais gêneros de bactérias ácido lácticas são: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (Tabela 2). Os membros do gênero *Lactobacillus*, ao contrário dos demais gêneros, possuem uma grande diversidade na composição do DNA e portanto não constituem um grupo homogêneo.

Tabela 1: Diferenciação dos principais gêneros de bactérias ácido lácticas.

Gênero	Formato e arranjo	Tipo de fermentação	DNA (Mol % GC)
<i>Streptococcus</i>	cocos em cadeia	homofermentativos	34 - 46
<i>Leuconostoc</i>	cocos em cadeia	heterofermentativo	38 - 41
<i>Pediococcus</i>	cocos em tétrades	homofermentativos	34 - 42
<i>Lactobacillus</i>	(1) bastonetes, em geral em cadeia	homofermentativo	32 - 53
	(2) bastonetes, em geral em cadeia	heterofermentativo	34 - 53
<i>Enterococcus</i>	cocos em cadeia	homofermentativos	38 - 40
<i>Lactococcus</i>	cocos em cadeia	homofermentativos	38 - 41

Fonte: BROCK et al., 1994.

Os gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus* surgiram da necessidade de se distinguir os *Streptococcus* não patogênicos, das espécies patogênicas ao homem. O gênero *Lactococcus* contém os streptococos de importância aos laticínios enquanto que o gênero *Enterococcus* engloba os streptococos de origem fecal. Os organismos que permaneceram no gênero *Streptococcus* foram divididos em dois grupos: subgrupo Pyogenes e subgrupo Viridans.

Algumas cepas de *Leuconostoc* produzem grandes quantidades de polissacarídeo (α -1,6-giucana) quando cultivadas em sacarose. Outras cepas de *Leuconostoc* produzem polímeros de frutose denominados levanas.

Os lactobacilos homofermentativos podem ser divididos em dois grupos. Um deles envolve bastonetes longos, que crescem a 45°C, mas não a 15°C, e o outro envolve bastonetes curtos que crescem a 15°C, e apresentam crescimento variável a 45°C. Os *Lactobacillus* são normalmente mais resistentes a condições ácidas do que as outras bactérias ácido lácticas, sendo capazes de crescer bem em valores de pH ao redor de 4 a 5. Os lactobacilos raramente são patogênicos.

2.2.5 - "Shelf life" das salsichas

O "shelf life" de um alimento pode ser definido como sendo a data após a qual o mesmo não apresenta mais um nível de qualidade aceitável (LABUZA, 1982).

A indústria de alimentos utiliza inúmeros métodos de preservação para retardar os processos deteriorantes e dessa forma estender o período durante o qual um nível aceitável de qualidade seja mantido (JUDGE et al., 1989).

Na Tabela 2 a seguir são apresentados os parâmetros microbiológicos e respectivos limites para a salsicha tipo Frankfurt, adotados por uma empresa de alimentos do Brasil:

Tabela 2: Parâmetros e limites microbiológicos para a salsicha tipo Frankfurt.

Parâmetro	Limite máximo
Contagem total de mesófilos (UFC/g)	$5,0 \times 10^5$
Bolores e Leveduras (UFC/g)	$5,0 \times 10^2$
Coliformes fecais (NMP/g ou UFC/g)	$5,0 \times 10^1$
Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	$2,0 \times 10^1$
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$< 1,0 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> spp (25g)	ausente

Fonte: Empresa de alimentos do Brasil.

Sendo assim, até a data de validade declarada na embalagem, nenhuma amostra de salsicha poderá apresentar uma contaminação acima dos valores citados na Tabela 2. Complementando este requisito legal, as características sensoriais (textura, cor, sabor e odor) também deverão estar de acordo com o estabelecido para o produto.

A velocidade de deterioração das salsichas está relacionada como a temperatura de estocagem, sendo que quanto maior a temperatura de estocagem, maior a velocidade de deterioração e portanto, menor o prazo de validade (MARINKOVIC, 1983).

Em um trabalho realizado com amostras de salsichas do tipo Frankfurter (entre outros embutidos) embaladas a vácuo, a deterioração da qualidade do produto estocado a 7°C ocorreu após 8 a 10 dias de estocagem, quando a contagem total de bactérias (principalmente *Lactobacillus*), excedia 10^8 UFC/g (SINELL & LUKE, 1978).

Uma das formas de se avaliar o "shelf life" de alimentos em fase de desenvolvimento ou submetidos a condições de estocagem normal ou de abuso é através da aplicação da microbiologia preditiva (WHITING & BUCHANAN , 1997).

3 – OBJETIVO

Ajustar e validar um modelo matemático, para descrever o comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas em salsichas armazenadas sob refrigeração (4°C e 8°C) e sob condições de abuso de temperatura de estocagem (12°C, 16°C e 20°C).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Descrição do experimento

O material utilizado para os experimentos foram salsichas embaladas à vácuo obtidas conforme fluxograma constante no apêndice A.

Foram coletadas amostras provenientes de 4 lotes de 7 toneladas de salsichas, fabricados em 28/08/98 (lote 1), 11/12/98 (lotes 2 e 3) e 18/01/99 (lote 4). De cada lote foi retirada uma amostra de aproximadamente 125 pacotes de salsichas, e cada grupo de 25 pacotes foi submetido a uma temperatura de estocagem diferente.

O processo de fabricação dos lotes de salsichas permaneceu sob controle quanto às variáveis que poderiam influir no crescimento microbiano:

- tipo de matéria-prima
- tipo e quantidade dos ingredientes
- temperatura da massa na saída do cutter (processo de trituração da matéria-prima);
- temperatura da massa na saída do Loboy (processo de emulsificação)
- temperatura de pasteurização;
- pH do tanque ácido (utilizado para fixar o corante nas salsichas);
- temperatura da água do tanque de lavagem;
- temperatura do produto na saída do tanque de lavagem;
- temperatura da água do chiller (processo de resfriamento das salsichas);

- temperatura do produto na saída do chiller;
- processo de higienização dos equipamentos e meio ambiente.

As temperaturas de estocagem utilizadas foram:

- 4°C (temperatura máxima de armazenamento indicada na embalagem do produto)
- 8°C (temperatura máxima de comercialização/transporte indicada na embalagem do produto)
- 12°C, 16°C e 20°C (temperaturas de abuso).

Foram utilizadas três tipos de estufas para a estocagem das amostras:

- Câmara de germinação, modelo 347 CDG, marca Fanem;
- Estufa incubadora para B.O.D., modelo 347 FG, marca Fanem e
- Estufa modelo CDC 44, marca Ética.

A oscilação de temperatura das estufas foi inferior a 1°C .

A frequência de amostragem foi estimada a partir dos resultados de um estudo piloto, a fim de se obter dados suficientes para representar as fases lag, exponencial e estacionária e principalmente as áreas de transição entre estas fases.

A cada intervalo de tempo pré-estabelecido, e específico para cada temperatura, um pacote de salsichas foi retirado da estufa referente à temperatura desejada e as salsichas analisadas quanto ao número de bactérias mesófilas e lácticas por grama. Também foi acompanhada a variação do valor de pH durante a estocagem com o objetivo de uma avaliação descritiva.

As determinações do número de bactérias mesófilas e lácticas por grama, conforme metodologia descrita a seguir (seções 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente), foram realizadas imediatamente após a retirada das amostras das estufas. No caso da determinação do valor de pH (seção 4.3.3), as amostras que não eram analisadas no mesmo dia, foram

congeladas, a fim de assegurar a exatidão do resultado, e analisadas posteriormente.

Para contagem de bactérias mesófilas e valor de pH existem resultados provenientes dos quatro lotes, enquanto que para contagem de bactérias lácticas existem resultados dos últimos três lotes.

4.2 - Descrição da análise dos dados

4.2.1 - Descrição das variáveis

- As variáveis independentes envolvidas no estudo foram:

- lote (4 lotes de salsichas fabricados em dias/horários diferentes);

- tempo de armazenamento (em horas);

- temperatura (em °C).

- As variáveis dependentes foram:

- logaritmo do número de bactérias mesófilas;

- logaritmo do número de bactérias lácticas;

- valor de pH (adimensional)

4.2.2 - Análise descritiva dos dados

A Análise Descritiva foi realizada a partir do agrupamento dos dados de três formas diferentes, sendo:

- dados agrupados por lote e temperatura, visando a análise da relação entre as variáveis dependentes;

- dados agrupados por lote e variável dependente, visando a análise do efeito da temperatura sobre cada variável dependente, e;

- dados agrupados por temperatura e tipo de bactéria, visando a análise do efeito do lote sobre o comportamento das bactérias.

4.2.3 - Análise inferencial dos dados

A análise inferencial dos dados foi conduzida visando o ajuste de uma equação matemática que relacionasse o número de bactérias mesófilas com o tempo de estocagem e temperatura. Também foi conduzida uma análise inferencial para ajustar uma equação matemática que relacionasse o número de bactérias lácticas com o tempo de estocagem e temperatura.

Devido a grande aplicação do modelo de Gompertz modificado, para descrever curvas de crescimento microbiano, este modelo foi escolhido para ser ajustado aos dados do trabalho.

Para ajustar as equações matemáticas, foi utilizada a técnica estatística de Regressão Não Linear (método de Gauss-Newton).

As suposições do modelo são que os erros são independentes e identicamente distribuídos de acordo com uma Distribuição Normal com média zero e variância constante, ou seja $e_i \sim N(0, \sigma^2)$.

4.2.3.1 - Ajuste e comparação de modelos para descrever a variação do número de bactérias por temperatura

Inicialmente o modelo de Gompertz modificado foi ajustado para cada temperatura e tipo de bactéria. Em seguida, os parâmetros dos modelos foram comparados, com o objetivo de verificar quais deles eram afetados pela mudança de temperatura.

O ajuste de modelos de regressão não linear é feito através de procedimentos iterativos, que requerem valores iniciais para as estimativas dos parâmetros. Para tanto, esses valores foram obtidos traçando-se regressões não paramétricas, pelo método "Cubic Spline" (HASTIE & TIBSHIRANI, 1990), nos diagramas de dispersão do logaritmo do número de bactérias em função do tempo, para cada temperatura e tipo de bactéria. As curvas obtidas estão representadas nos gráficos 1 a 6 para as bactérias mesófilas e nos gráficos 7 a 12 para as bactérias lácticas. Os valores iniciais para cada parâmetro foram obtidos localizando-se cada um deles, de forma aproximada, nas

curvas estimadas. Como exemplo, através da curva estimada para as bactérias mesófilas à temperatura de 12°C (ver Gráfico 4), obtivemos as seguintes estimativas iniciais aproximadas:

$$\hat{A} = 1,8; \hat{B} = 0,01; \hat{C} = 8,5; \hat{M} = 110.$$

A comparação dos parâmetros dos modelos para cada tipo de bactéria e temperatura foi feita incluindo-se variáveis indicadoras de temperatura (variáveis dummies) (NETER, et al., 1996 a).

A partir dos resultados dessa comparação o modelo de Gompertz modificado foi ajustado novamente para cada tipo de bactéria, considerando-se os parâmetros comuns para todas as temperaturas. Os parâmetros influenciados pela temperatura foram então novamente testados para comprovar a dependência da temperatura.

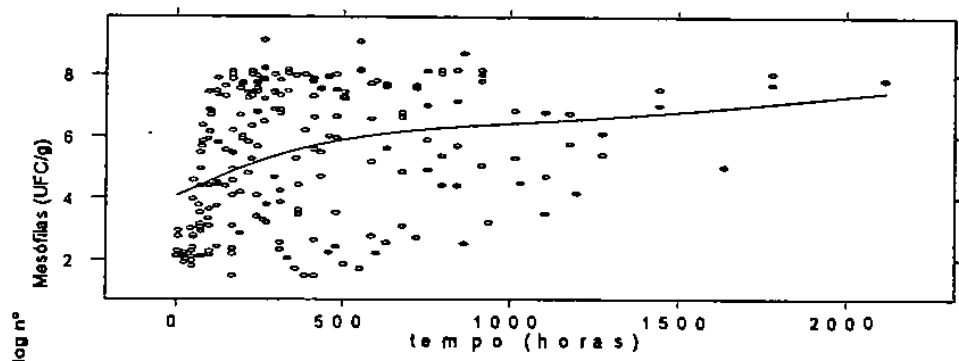


Gráfico 1: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para todas as temperaturas.

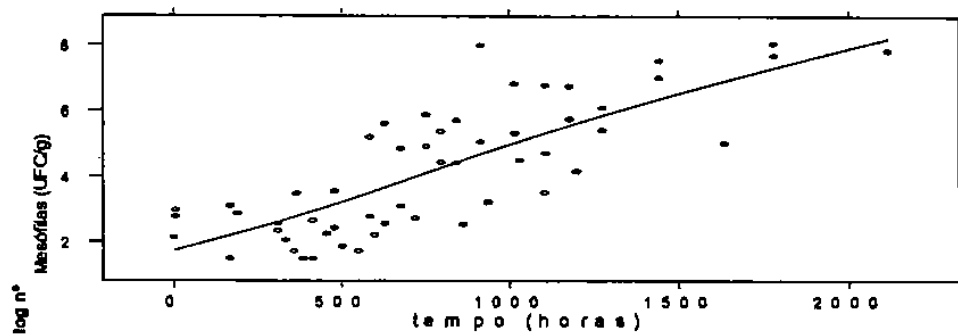


Gráfico 2: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 4°C.

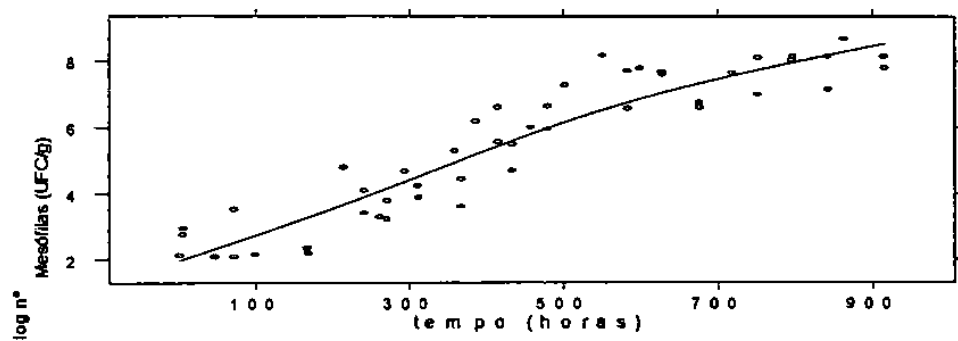


Gráfico 3: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 8°C.

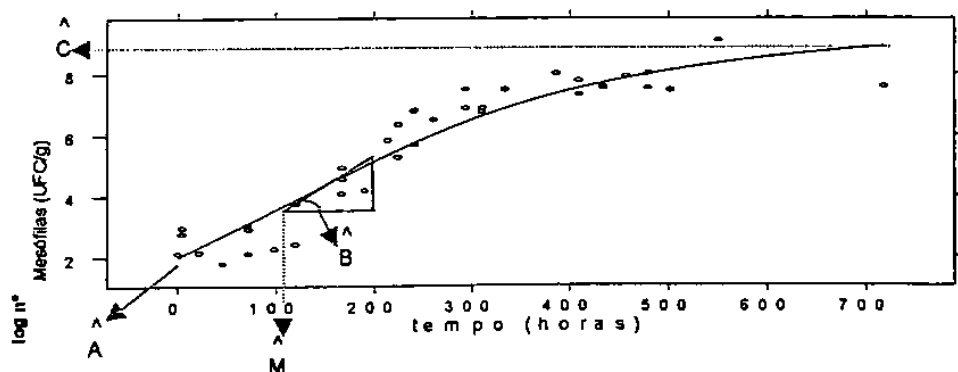


Gráfico 4: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 12°C.

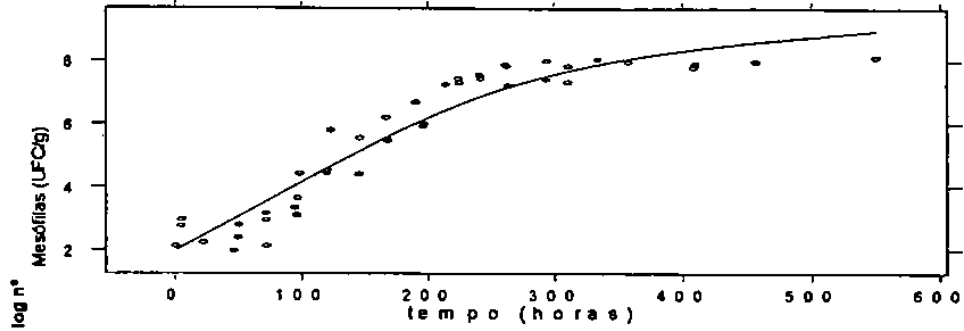


Gráfico 5: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 16°C.

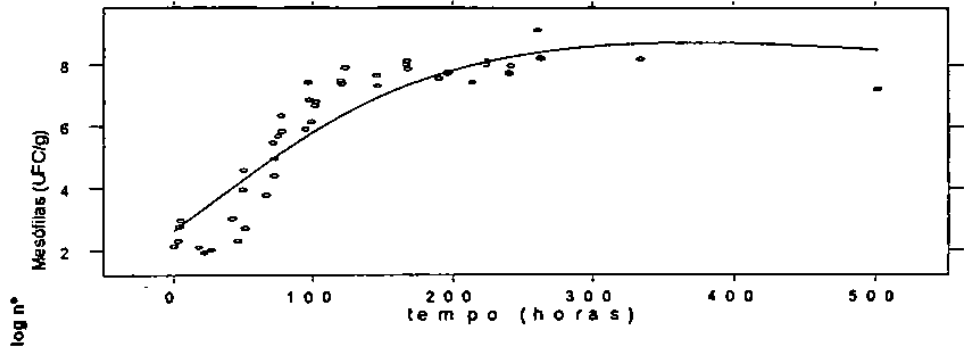


Gráfico 6: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo para a temperatura 20°C.

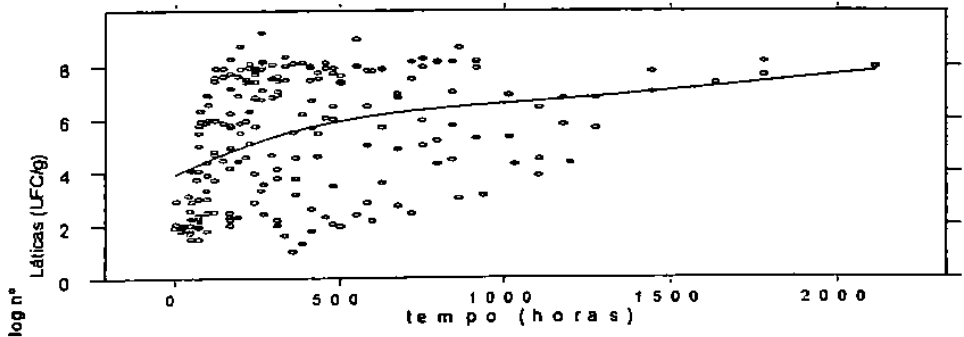


Gráfico 7: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para todas as temperaturas.

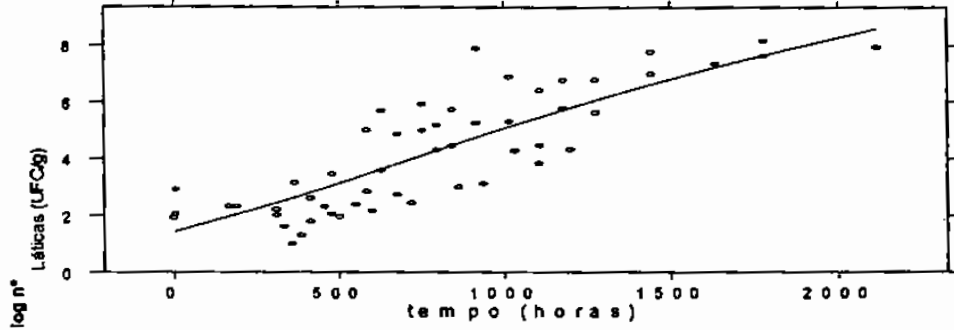


Gráfico 8: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 4°C.

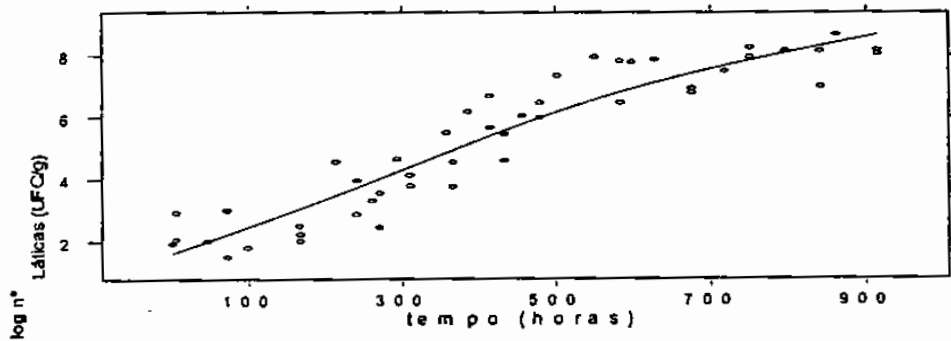


Gráfico 9: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 8°C.

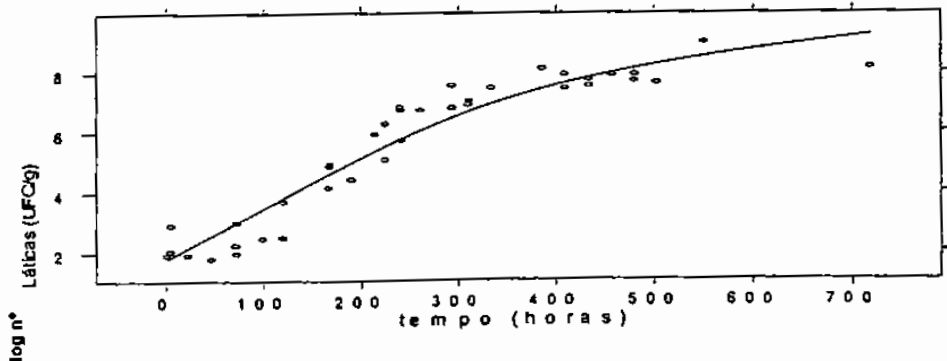


Gráfico 10: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 12°C.

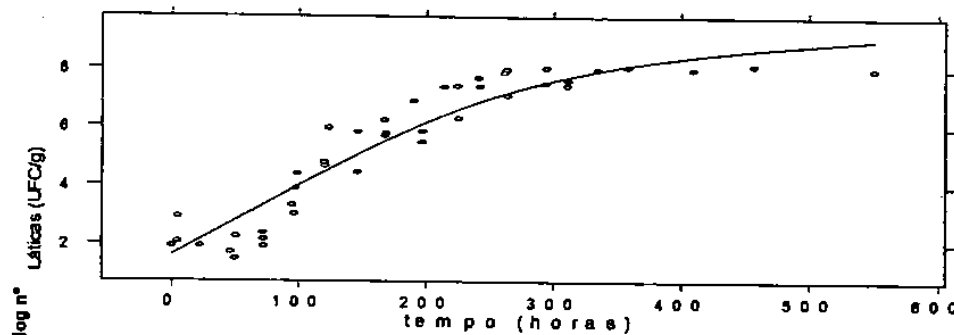


Gráfico 11: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 16°C.

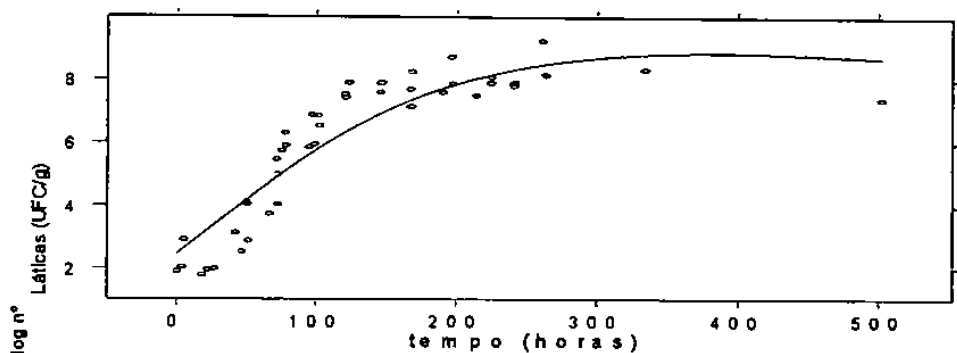


Gráfico 12: Regressão não paramétrica do log do número de bactérias lácticas em função do tempo para a temperatura 20°C.

4.2.3.2 - Ajuste de funções que relacionam os parâmetros B e M com a temperatura

Como os valores dos parâmetros B e M dependem da temperatura, foram estimadas funções que representassem o comportamento destes parâmetros em função da temperatura.

Foram testados os ajustes da função Linear (equações 14 e 15), Logarítmica (equações 16 e 17), Quadrática (equações 18 e 19) e Exponencial (equações 20 e 21), para verificar qual função melhor representa o comportamento do parâmetro B e do parâmetro M em função da temperatura.

Função linear:

$$B = g_0 + (g_1 \cdot w) \quad (14)$$

$$M = g_2 + (g_3 \cdot w) \quad (15)$$

Função logarítmica

$$B = g_0 + (g_1 \cdot \ln(w)) \quad (16)$$

$$M = g_2 + (g_3 \cdot \ln(w)) \quad (17)$$

Função quadrática

$$B = g_0 + (g_1 \cdot w) + (g_{11} \cdot w^2) \quad (18)$$

$$M = g_2 + (g_3 \cdot w) + (g_{33} \cdot w^2) \quad (19)$$

Função exponencial

$$B = g_0 e^{(g_1 \cdot w)} \quad (20)$$

$$M = g_2 e^{(g_3 \cdot w)} \quad (21)$$

Onde:

- w é a temperatura
- g_n são parâmetros a serem estimados

4.2.3.3 - Ajuste do modelo final

O modelo final foi ajustado substituindo-se os parâmetros B e M do modelo de Gompertz modificado, pelas expressões das funções que melhor explicam seus comportamentos.

4.2.3.4 - Teste das suposições do modelo

Para verificar se as suposições de **normalidade** e **homocedasticidade** assumidas pelo modelo eram satisfeitas, foi realizada uma análise de resíduos.

4.2.3.5 – Cálculo dos intervalos de confiança das previsões dos modelos

Foram selecionados valores das variáveis independentes (tempo e temperatura) dentro da faixa de variação dos dados considerados para a derivação do modelo e que representassem as diferentes fases de crescimento das bactérias mesófilas.

Os intervalos de confiança foram calculados aplicando-se um coeficiente de confiança de 0,95 e considerando a variância média ao quadrado dos dados da derivação do modelo ($\hat{\sigma}^2$), e o desvio padrão médio ao quadrado para uma nova previsão (\hat{s}^2).

4.2.3.6 – Validação dos modelos

Para a validação dos modelos foram calculados os valores de MSPR conforme descrito na seção 2.1.3.4.

A validação dos modelos também foi verificada a partir da análise visual dos gráficos de correlação entre os valores observados e os valores estimados e dos valores dos coeficientes de correlação linear de Pearson obtidos a partir desses gráficos.

4.3 - Métodos de análise de laboratório

4.3.1 - Contagem Total de Mesófilos

4.3.1.1 - Métodos de referência

- APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3ª ed. 1992.

- AOAC. FDA Bacteriological Analytical Manual . 8. ed. 1995.

4.3.1.2 - Meios de cultura e reagentes

Ágar Padrão para contagem em placa

Água Peptonada 0,1%

4.3.1.3 – Preparo dos meios de cultura e reagentes

a) Ágar padrão para contagem - PCA

Triptona	5,0 g	Equivalentes comerciais
Extrato de levedura	2,5 g	DIFCO - 0479
Dextrose	1,0 g	MERCK - 463
Ágar	15,0 g	OXOID - CM - 25
Água destilada	1000 ml	BBL - 11638
pH : 7,1 (± 0,2)		

Dissolver os ingredientes em banho-maria até a completa dissolução do ágar e distribuir porções de aproximadamente 15 ml em tubos de ensaio ou em erlenmeyer. Esterilizar em autoclave à 121°C (±1°C) por 15 minutos.

b) Água peptonada 0,1%

Peptona	1,0g
Água destilada	1000ml
pH : 7,0 (± 0,2)	

Dissolver os ingredientes e distribuir em frascos um volume que após a esterilização à 121°C por 15 min., corresponda a 225 ml.

4.3.1.4 – Procedimento analítico

- a) Pesar 25 g da amostra assepticamente em frasco estéril e adicionar 225ml de água peptonada 0,1%.
- b) Homogeneizar a amostra por 1 min em Stomacher.
- c) Preparar as diluições decimais necessárias a partir da primeira (1:10).
- d) Transferir alíquotas de 1 ml das diluições para placas de Petri individuais.
- e) Verter cerca de 15 ml de meio Ágar Padrão (PCA) previamente dissolvido e resfriado a 45°C .

- f) Homogeneizar a amostra e o meio de cultura pela movimentação suave das placas, numa superfície plana, de forma a descrever o número oito, de 8 a 10 vezes. Manter as placas em repouso até a solidificação do ágar.
- g) Incubar as placas invertidas, em estufa à 35°C (± 1°C) por 48h (± 2h).
- h) Efetuar a contagem das placas que apresentarem entre 25 a 250 colônias conforme orientação do item 4.3.1.5.

4.3.1.5 – Expressão dos resultados

- Placas com 25 a 250 colônias

O número de colônias multiplicado pelo fator de diluição é o número de microrganismos por grama ou mililitro da amostra analisada.

- Placas com mais de 250 colônias

Quando as placas de todas as diluições apresentarem mais de 250 colônias, selecionar para contagem aquelas correspondentes à maior diluição e expressar o resultado. Se não for possível contar todas as colônias da placa, mas o número de colônias por cm² estiver abaixo de 10, contar as colônias em 12 quadrados de 1 cm², 6 quadrados consecutivos na horizontal e vertical. Calcular o número médio dos quadrados e multiplicar pela área total de placa (65 cm² no caso da placa com diâmetro de 100 mm).

Se o número de colônias por cm², for maior que 10 , contar as colônias em quatro quadrados representativos da distribuição e calcular conforme acima. Se o número for maior que 100, apresentar o resultado como maior que 6.500 vezes o fator de diluição.

- Todas as placas com menos de 25 colônias

Expressar o resultado pelo número de colônias da placa de menor diluição.

- Placas com menos de 25 e mais de 250 colônias

Quando as placas apresentarem contagens abaixo de 25 e acima de 250 colônias, registrar o número mais próximo de 250 e expressar o resultado.

- Todas as placas sem colônias

Se as placas não apresentarem colônias, expressar o resultado como menor (<) do que a menor diluição utilizada.

4.3.2 - Contagem de bactérias lácticas

4.3.2.1 – Método de referência

APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3.ed. 1992.

4.3.2.2 – Meios de cultura e reagentes

Ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS)

Água peptonada 0,1%

4.3.2.3 – Preparo dos meios de cultura e reagentes

a) Ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS)

Meio de enriquecimento desenvolvido para favorecer o crescimento de *Lactobacillus* particularmente de produtos lácteos. Também permite um crescimento luxurioso de *Leuconostoc*, *Pediococcus* e lactobacilos de outras origens além do leite.

Peptona	10,0g	Equivalentes comerciais
Extrato de carne	8,0 g	OXOID - CM 361
Extrato de levedura	4,0 g	MERCK - 10660
Glicose	20,0 g	DIFCO- 0881
Sorbitano monooleato	1,0 g	
Fosfato dipotássico	2,0 g	

Acetato de sódio 3H ₂ O	5,0 g
Citrato de amônia	2,0 g
Sulfato de magnésio 7H ₂ O	0,2 g
Sulfato de manganês 4H ₂ O	0,05 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml
pH : 6,2 (± 0,2)	

Dissolver os ingredientes em banho-maria até a completa fusão do ágar e esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min.

b) Água peptonada 0,1%

idem 4.3.1.3 (b)

4.3.2.4 – Procedimento analítico

- a) Pesar 25 g da amostra assepticamente em frasco estéril e adicionar 225ml de água peptonada 0,1 %.
- b) Homogeneizar a amostra por 1 min, em Stomacher.
- c) Preparar as diluições decimais necessárias a partir da primeira (1:10).
- d) Transferir alíquotas de 1 ml das diluição para placas de Petri individuais.
- e) Verter cerca de 15 ml do meio de cultura previamente dissolvido e resfriado à 45°C.
- f) Homogeneizar a amostra e o meio de cultura pela movimentação suave das placas, numa superfície plana, de forma a descrever o número oito, de 8 a 10 vezes. Manter as placas em repouso até a solidificação do ágar.
- g) Adicionar uma sobrecamada do meio de cultura.
- h) Esperar solidificar o meio . Incubar as placas invertidas, em estufa, à 30°C (± 1° C) por 48 a 72 h.

i) Efetuar a contagem das placas que apresentarem entre 25 a 250 colônias. Considerar bactérias lácticas as colônias creme a creme esbranquiçado, pequenas e às vezes lentilhadas.

Calcular o resultado multiplicando pelo inverso da diluição e expressar o número de bactérias lácticas por ml ou g da amostra.

4.3.3 - Determinação do valor de pH

4.3.3.1 - Método de referência

Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes, 1981 (adaptado).

4.3.3.2 – Procedimento analítico

O valor do pH foi determinado a partir de uma mistura de 50g da amostra previamente triturada, adicionada de 20ml de água destilada, seguida de repouso por aproximadamente 3 horas. Foi empregado um pHmetro modelo 654, fabricado pela Metrohm.

4.4 - Programas computacionais

Microsoft Excel *for Windows*®, versão 97, Microsoft Inc., Redmond
(Gráficos da análise descritiva)

Minitab *for Windows*®, versão 11.12, Minitab Inc., Pensilvânia
(Análise dos resíduos)

S-PLUS *for Windows*®, versão 4.5, Data Analysis Products Division,
Seattle
(Gráficos dos testes não paramétricos e ajuste dos modelos.)

4.5 -Técnicas estatísticas (entre parênteses a classificação ISI *)

Análise Descritiva Unidimensional (03:010)

Análise de Regressão Não Linear (07:140)

Estimação Não Paramétrica (04:080)

(*) classificação internacional das técnicas estatísticas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Resultados e discussão da análise descritiva

5.1.1 - Comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas e comportamento do valor de pH a cada temperatura e lote

Analisando os Gráficos 13 a 32, podemos verificar que o valor de pH tende a decair conforme o tempo de armazenagem aumenta assim como é possível se observar a relação direta entre o crescimento do número de bactérias e o comportamento do valor de pH, ou seja, conforme o número de bactérias cresce, o pH diminui. Este fato é notado principalmente para as temperaturas mais altas (Gráficos 17, 22, 27 e 32), pois a estas temperaturas, o crescimento do número de bactérias ocorre em uma velocidade maior. A queda do valor do pH é decorrente do ácido láctico produzido pelas bactérias lácticas (BROCK et al., 1994).

Através desses gráficos, podemos ainda confirmar a tendência de crescimento da contagem de bactérias ao longo do tempo de armazenamento.

Para os lotes 2, 3 e 4, em que foram colhidas informações para bactérias mesófilas e bactérias lácticas (Gráficos 18 a 32), notamos que o número de bactérias mesófilas e lácticas ao longo do tempo de estocagem e o comportamento do crescimento destas bactérias tende a ser similar.

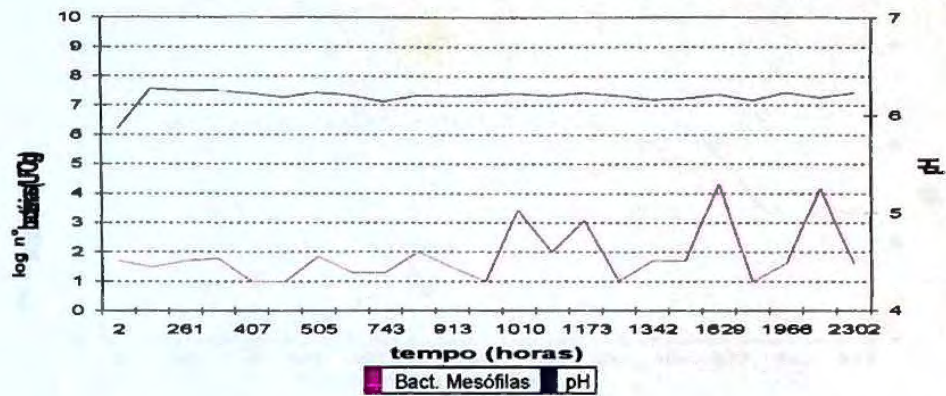


Gráfico 13: Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 4°C no lote 1.

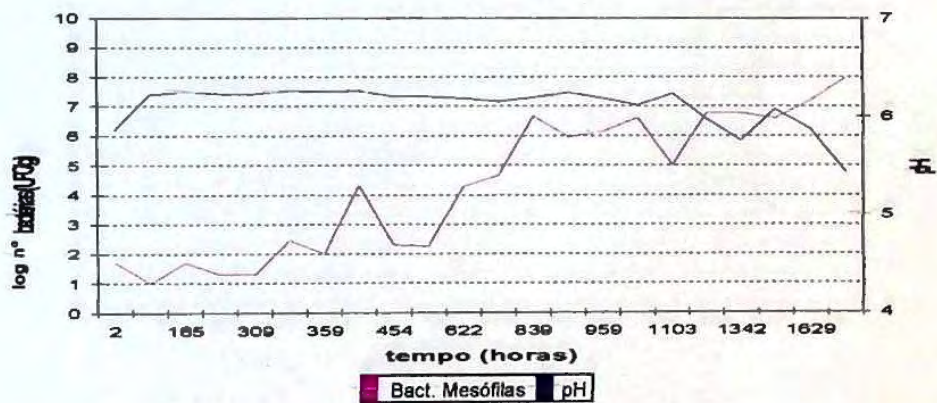


Gráfico 14: Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 8°C no lote 1.

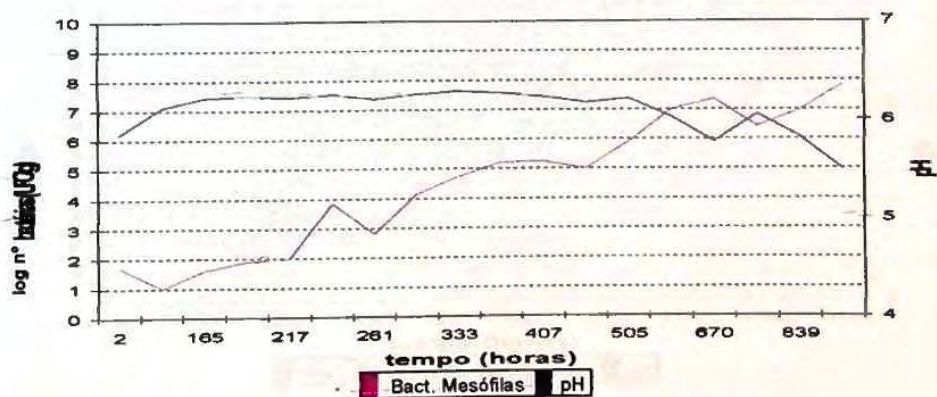


Gráfico 15: Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 12°C no lote 1.

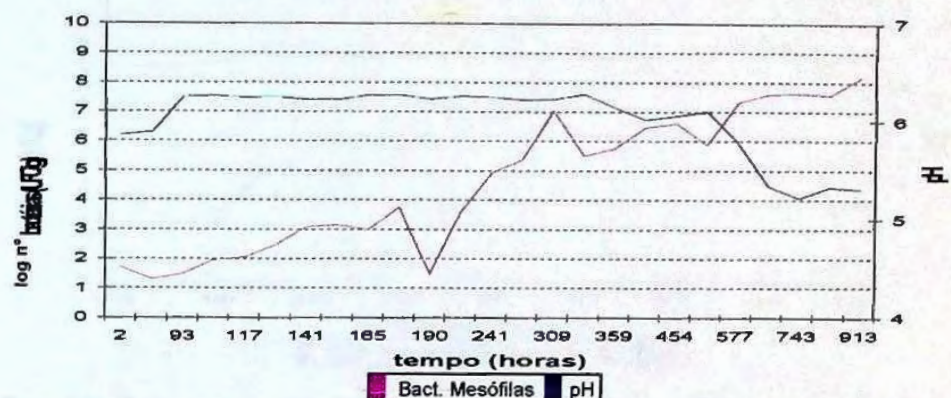


Gráfico 16: Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 16°C no lote 1.

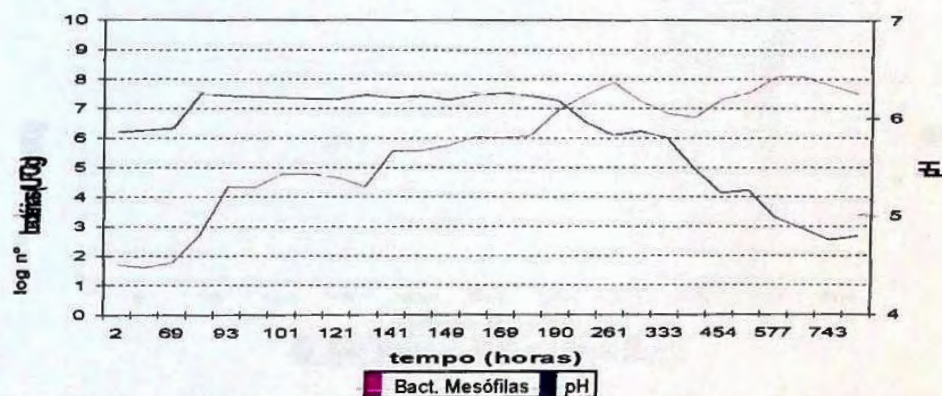


Gráfico 17: Comportamento das bactérias mesófilas e do pH para a temperatura 20°C no lote 1.

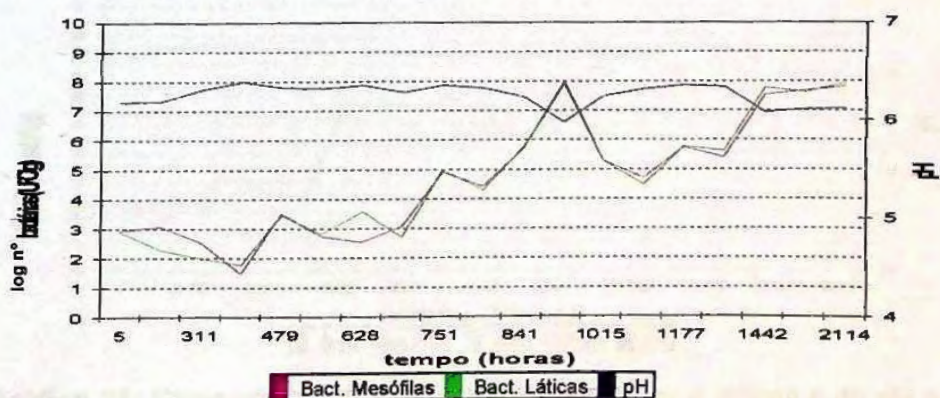


Gráfico 18: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 4°C no lote 2.

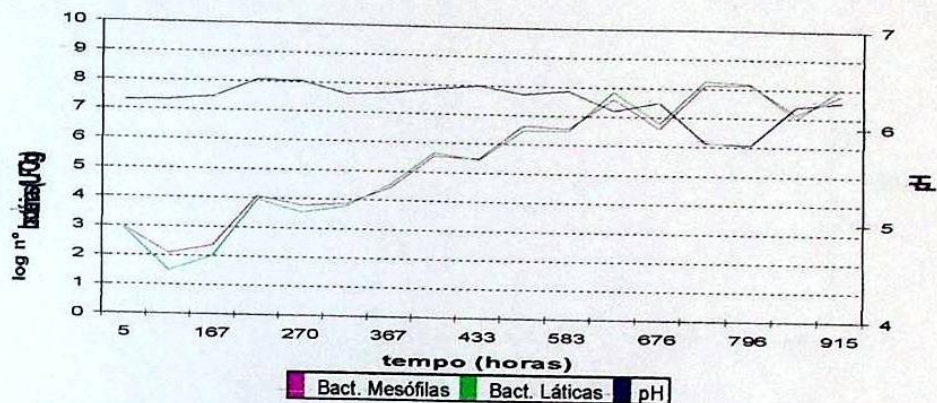


Gráfico 19: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 8°C no lote 2.

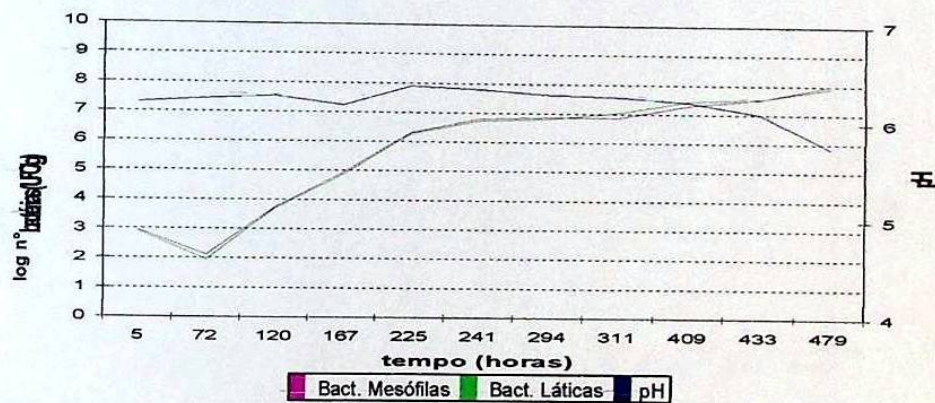


Gráfico 20: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 12°C no lote 2.

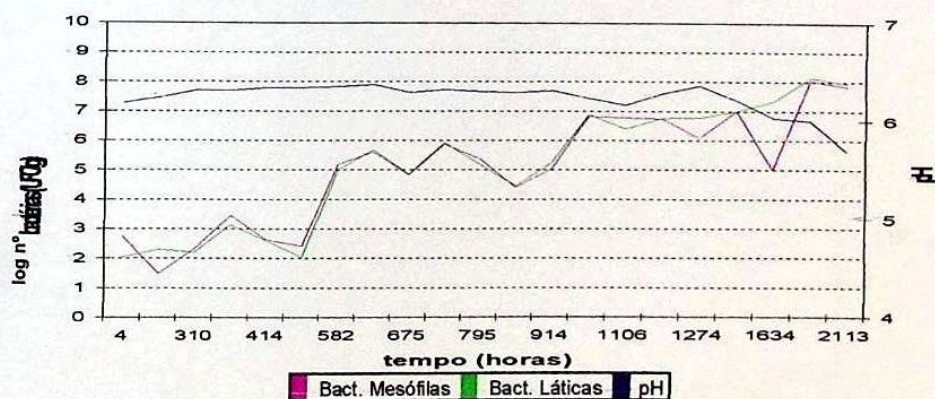


Gráfico 21: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 16°C no lote 2.

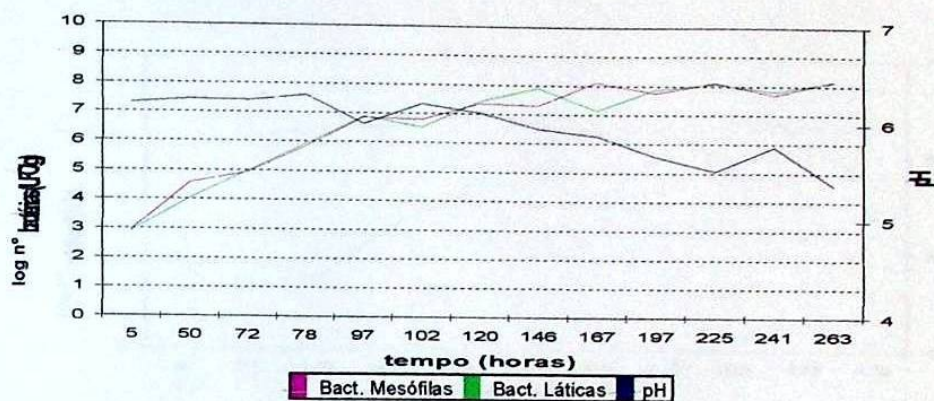


Gráfico 22: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 20°C no lote 2.

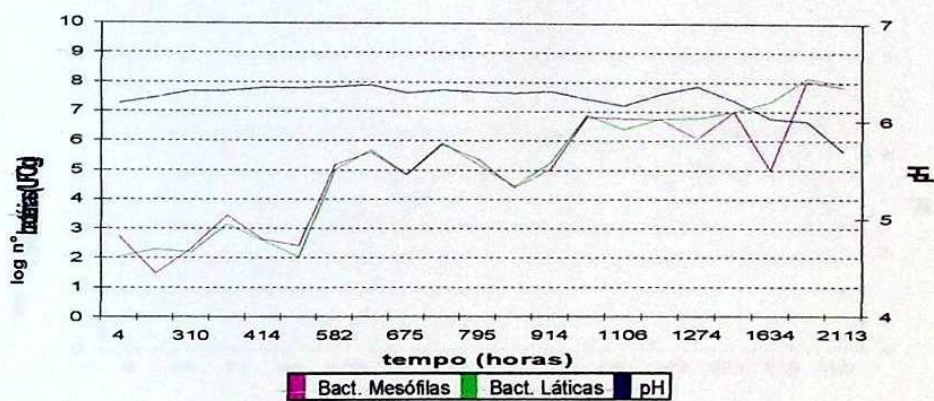


Gráfico 23: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 4°C no lote 3.

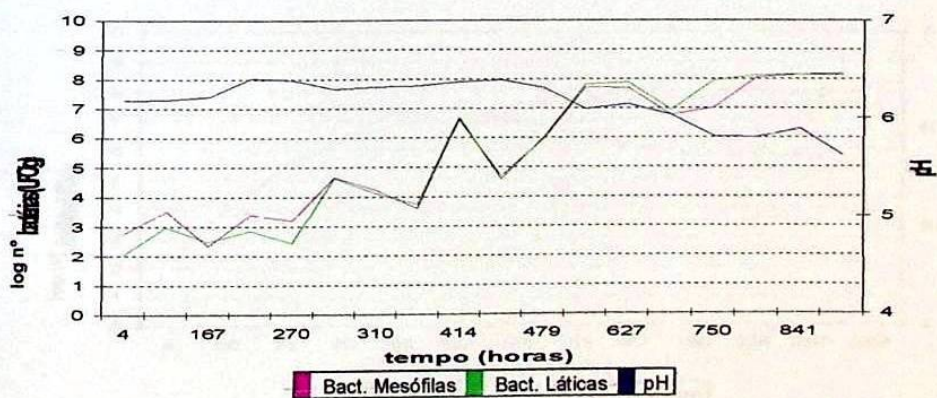


Gráfico 24: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 8°C no lote 3.

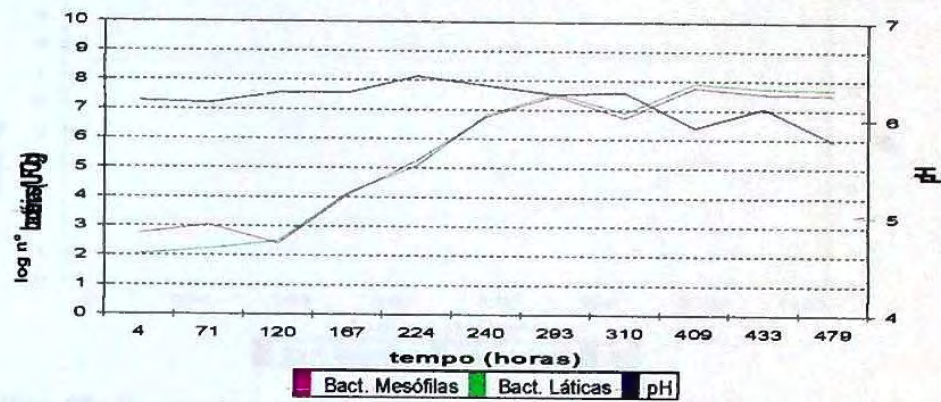


Gráfico 25: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 12°C no lote 3.

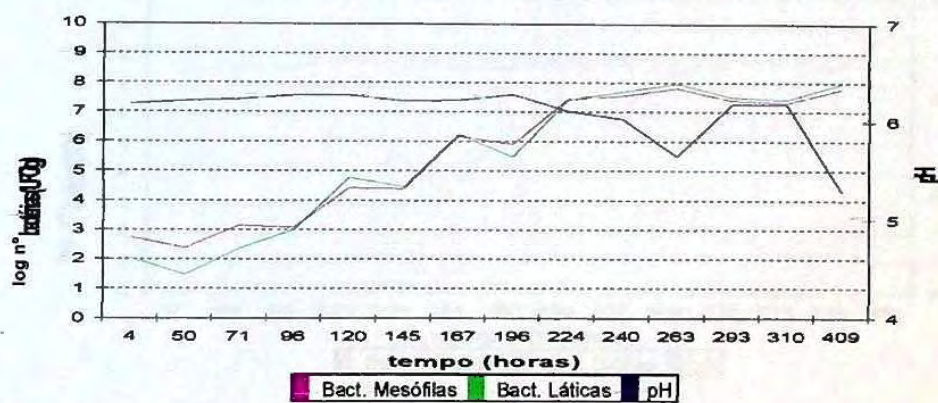


Gráfico 26: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 16°C no lote 3.

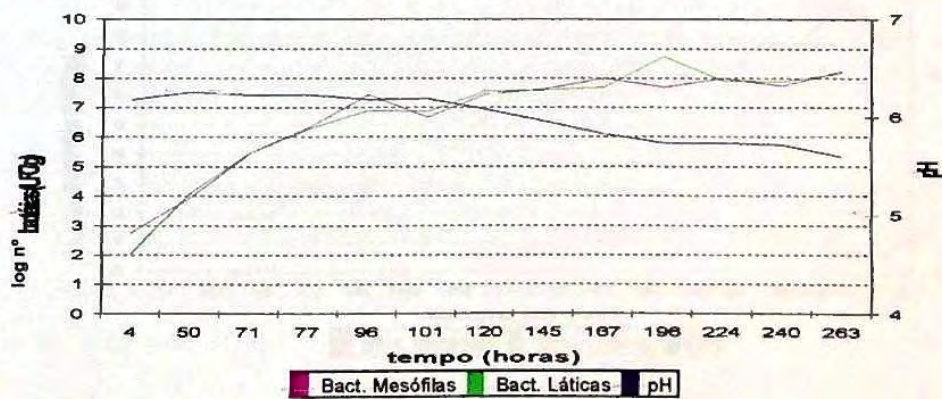


Gráfico 27: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 20°C no lote 3.

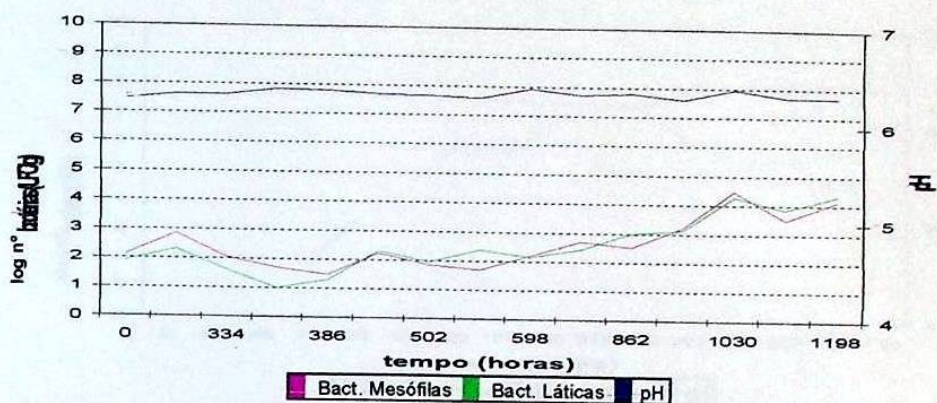


Gráfico 28: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 4°C no lote 4.

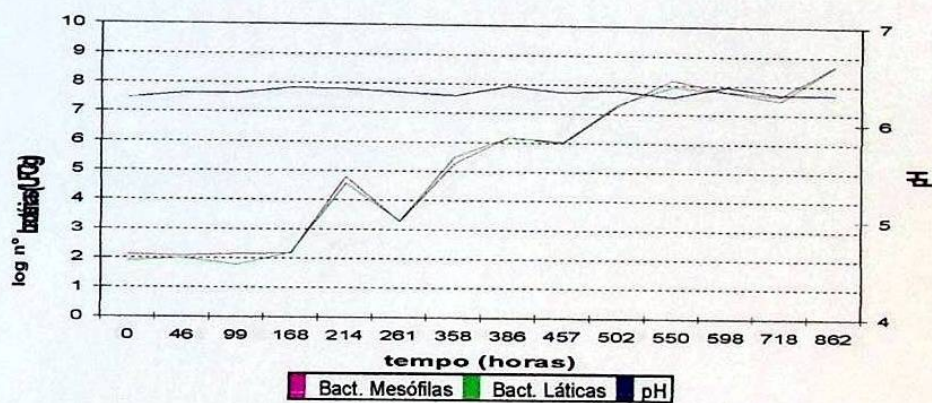


Gráfico 29: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 8°C no lote 4.

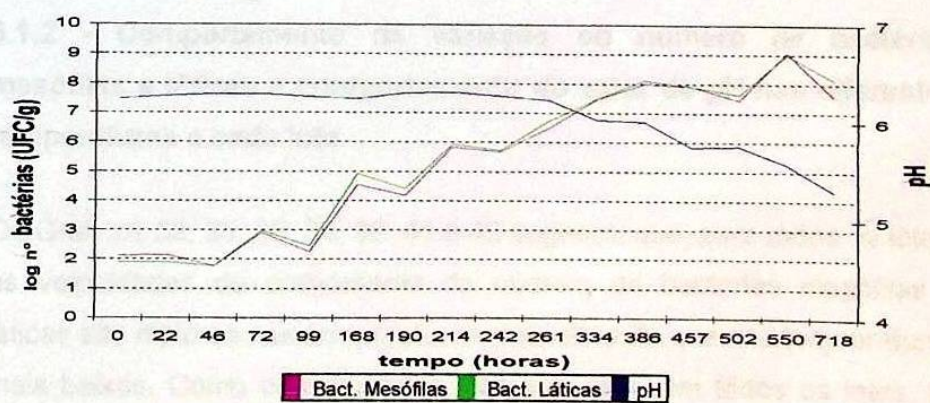


Gráfico 30: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 12°C no lote 4.

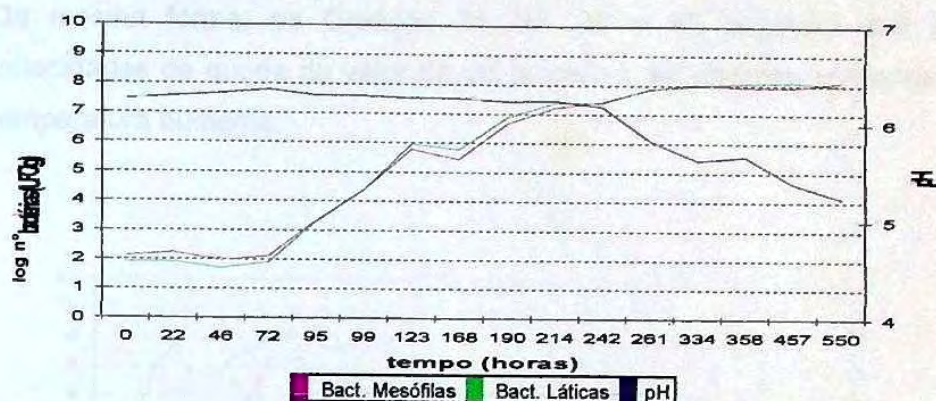


Gráfico 31: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 16°C no lote 4.

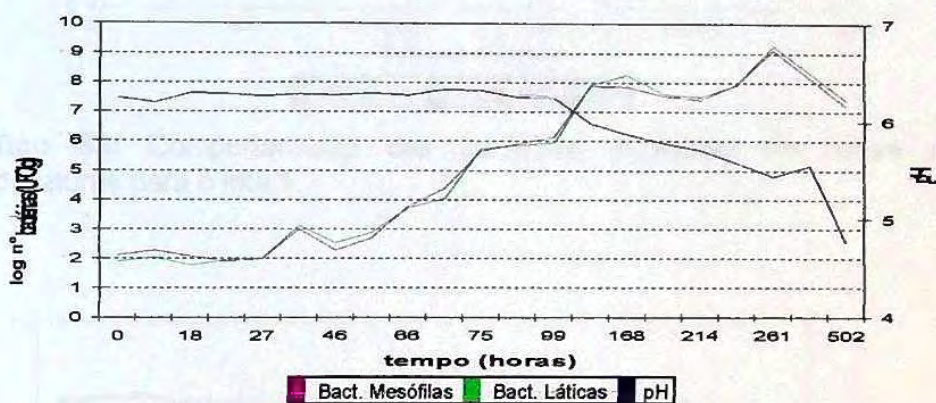


Gráfico 32: Comportamento das bactérias mesófilas e lácticas e do pH para a temperatura 20°C no lote 4.

5.1.2 - Comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas e comportamento do valor de pH nas diferentes temperaturas a cada lote

Os Gráficos 33, 35, 36, 38, 39, 41 e 42 sugerem que, para todos os lotes, as velocidades de crescimento do número de bactérias mesófilas e lácticas são maiores nas temperaturas mais altas do que nas temperaturas mais baixas. Como consequência, notamos que, em todos os lotes, as bactérias atingem a fase estacionária mais rápido nas temperaturas mais elevadas.

Da mesma forma, os Gráficos 34, 37, 40 e 43 sugerem que as velocidades de queda do valor de pH tendem a ser maiores conforme a temperatura aumenta.

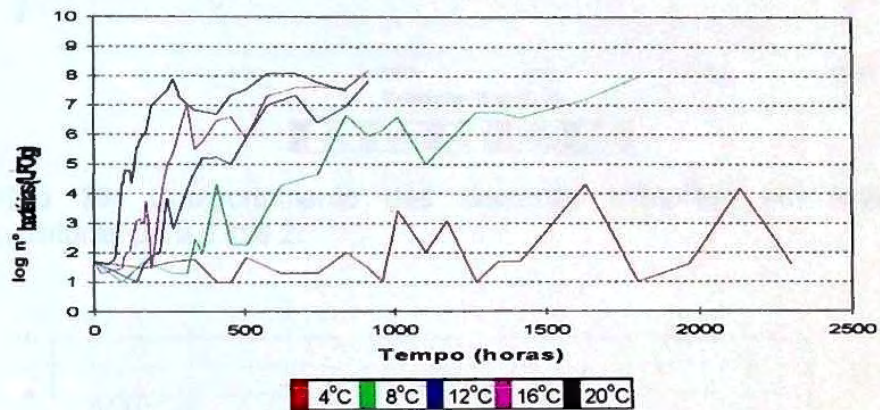


Gráfico 33: Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 1.

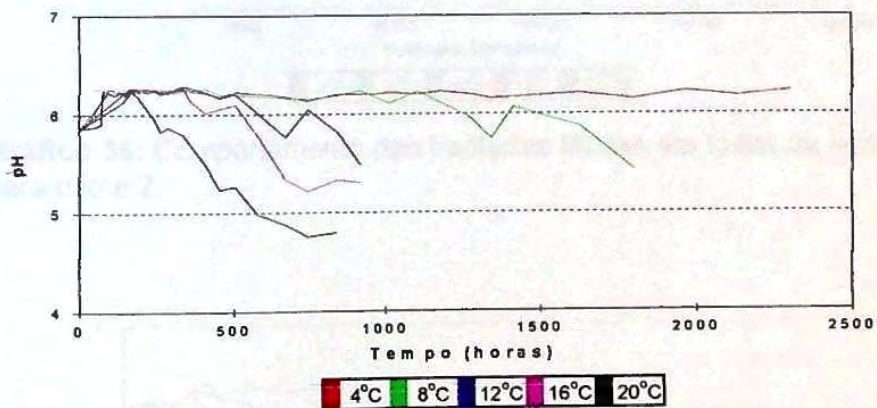


Gráfico 34: Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 1.

Gráfico 37: Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 2.

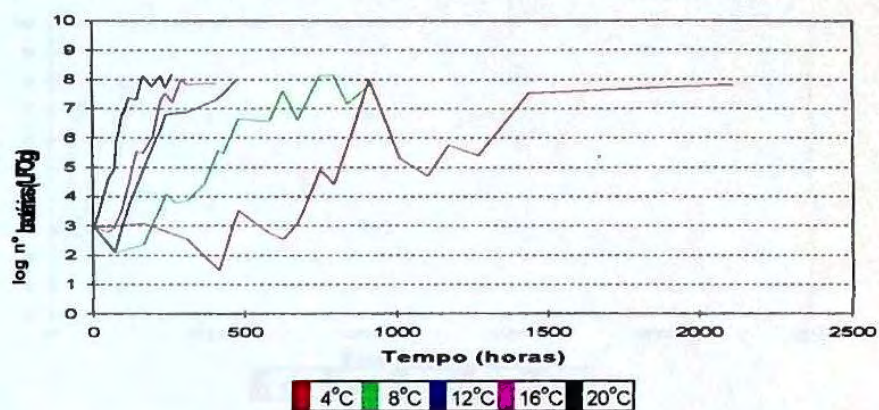


Gráfico 35: Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 2.

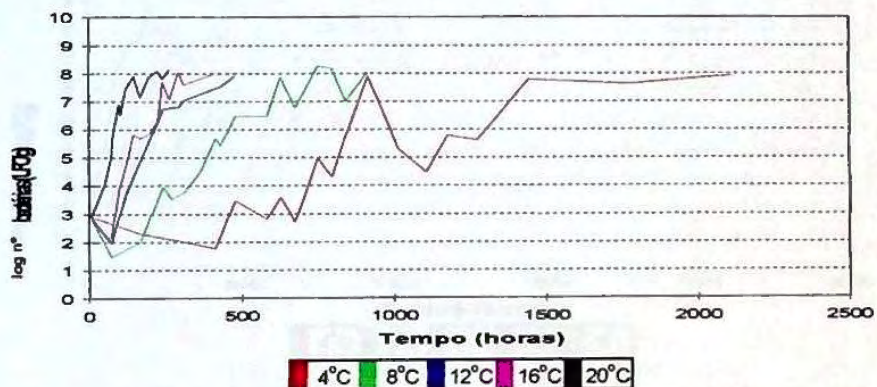


Gráfico 36: Comportamento das bactérias lácticas em todas as temperaturas para o lote 2.

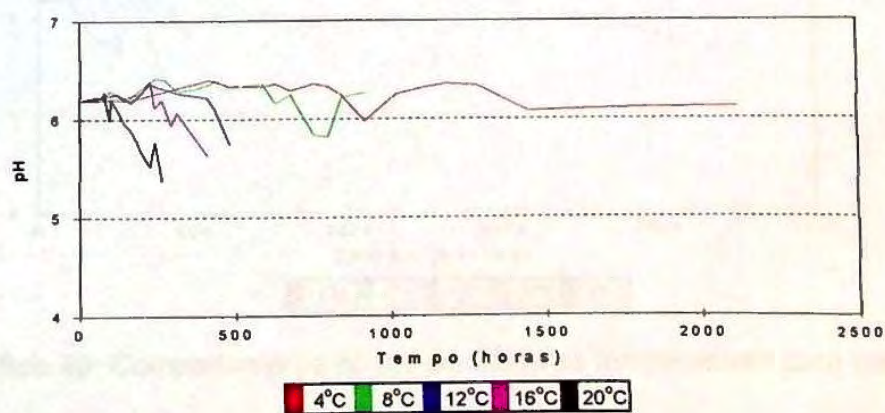


Gráfico 37: Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 2.

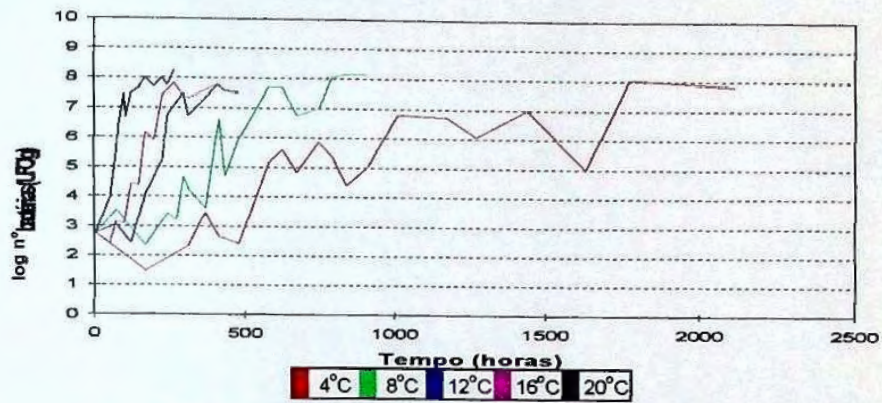


Gráfico 38: Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 3.

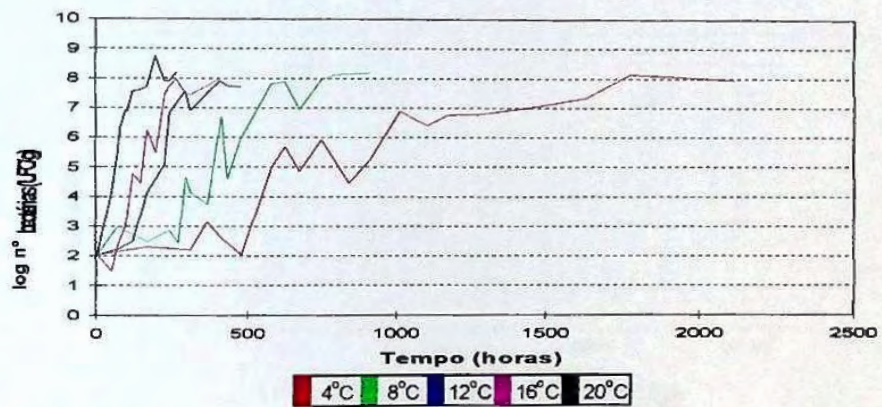


Gráfico 39: Comportamento das bactérias lácticas em todas as temperaturas para o lote 3.

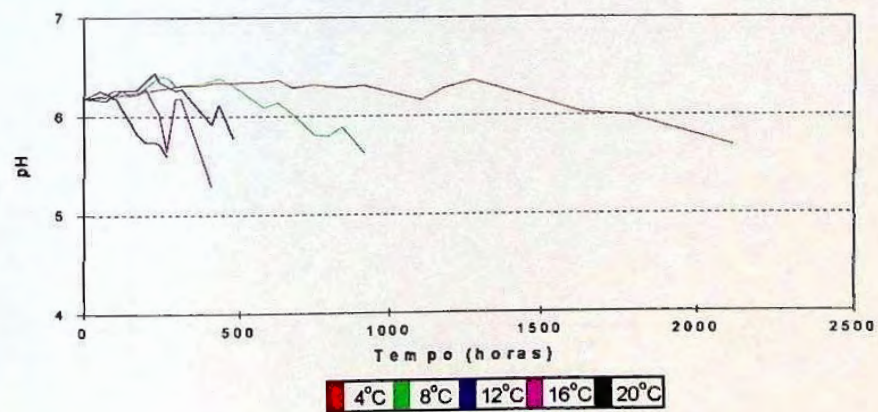


Gráfico 40: Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 3.

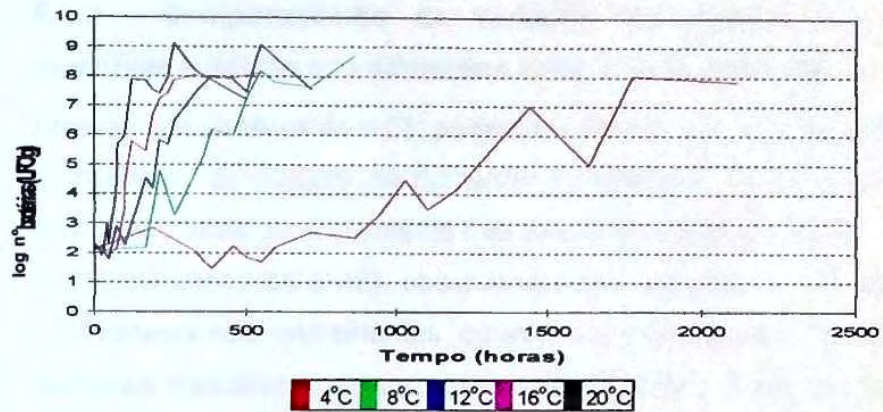


Gráfico 41: Comportamento das bactérias mesófilas em todas as temperaturas para o lote 4.

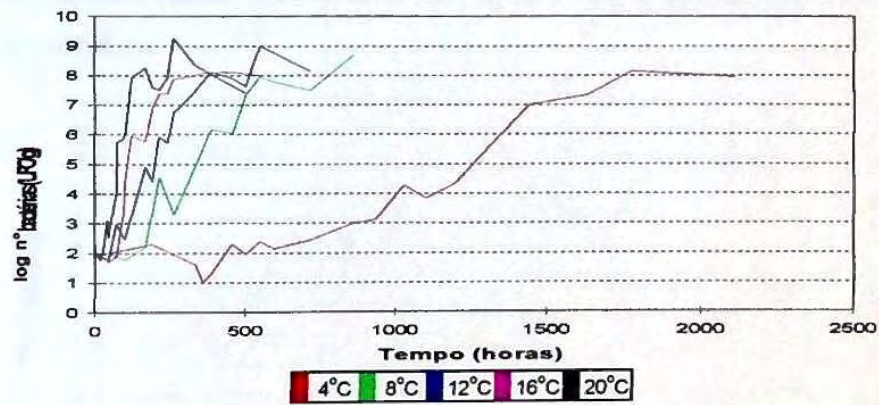


Gráfico 42: Comportamento das bactérias lácticas em todas as temperaturas para o lote 4.

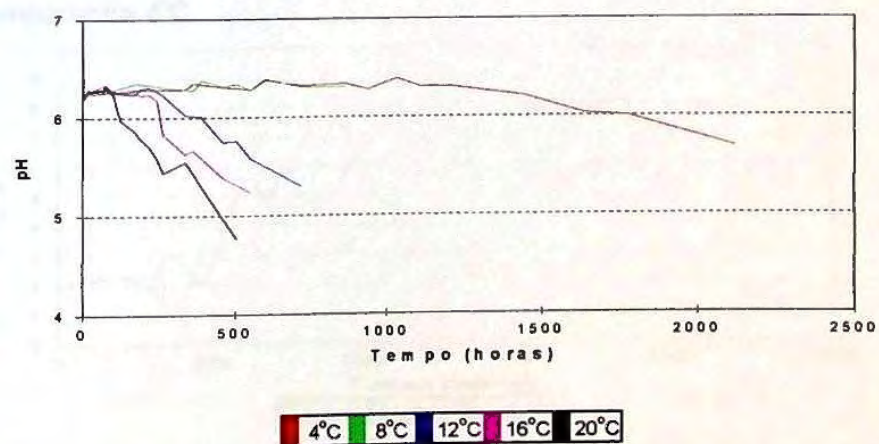


Gráfico 43: Comportamento do pH em todas as temperaturas para o lote 4.

5.1.3 - Comportamento da variação do número de bactérias mesófilas e lácticas nos diferentes lotes a cada temperatura

Através dos Gráficos 44 a 53, podemos verificar que o comportamento do crescimento do número de bactérias mesófilas e lácticas é diferenciado nos quatro lotes, principalmente nas temperaturas mais baixas.

A 4°C (Gráficos 44 e 45), observamos que os lotes 2 e 3 apresentam comportamentos semelhantes quanto ao crescimento do número de bactérias mesófilas e lácticas. Isto provavelmente é devido ao fato destes dois lotes terem sido fabricados no mesmo dia, com apenas 30 minutos de diferença. O lote 1 possui um comportamento diferente, praticamente não apresentando crescimento do número de bactérias mesófilas nesta temperatura.

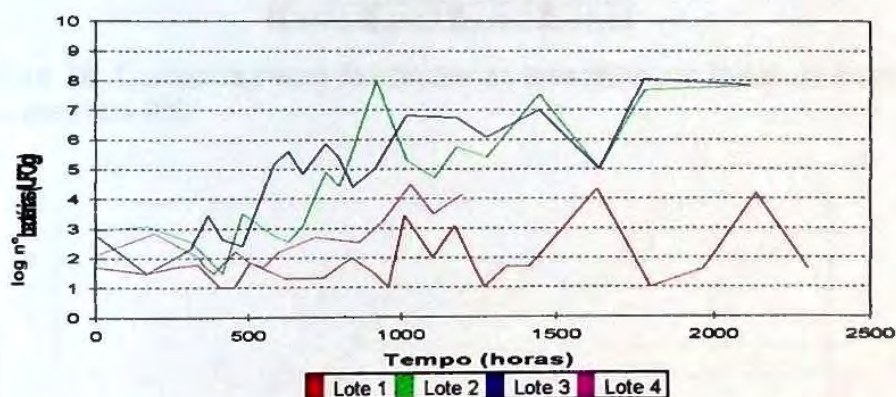


Gráfico 44: Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 4°C.

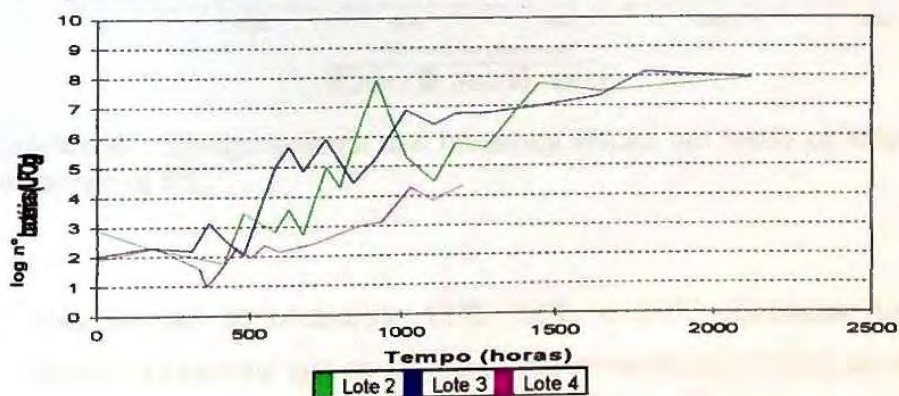


Gráfico 45: Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 4°C.

Na temperatura 8°C (Gráficos 46 e 47), verificamos que a tendência de crescimento do número de bactérias mesófilas nos 4 lotes e lácticas nos lotes 2, 3 e 4 é muito semelhante, apesar do crescimento do número de bactérias mesófilas no lote 1 ser mais lento.

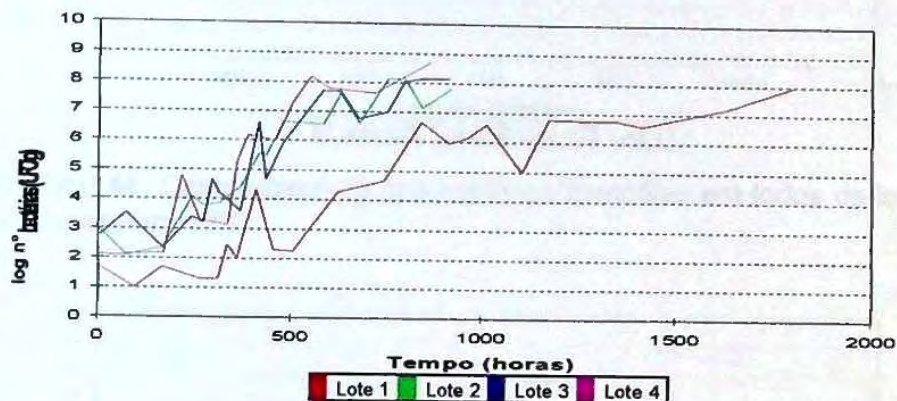


Gráfico 46: Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 8°C.

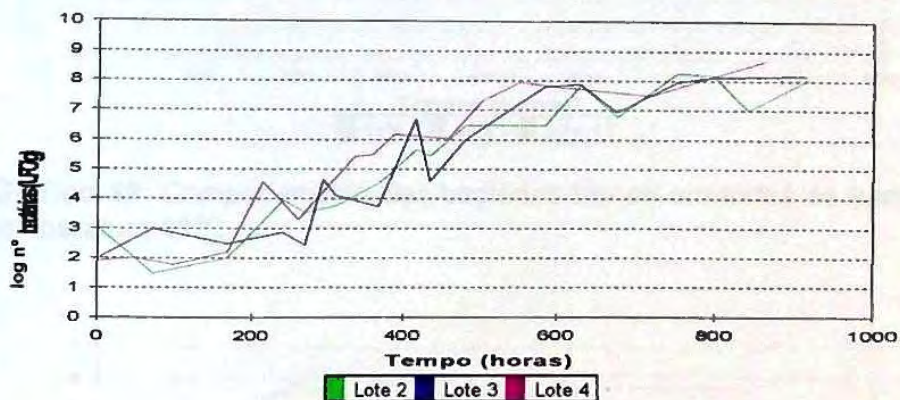


Gráfico 47: Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 8°C.

Nas demais temperaturas, 12°C, 16°C e 20°C (Gráficos 48 a 53), podemos observar que as curvas de crescimento do número de bactérias mesófilas e lácticas nos lotes 2, 3 e 4 são muito parecidas. As curvas de crescimento do número de bactérias mesófilas no lote 1 parecem ser diferentes das curvas nos demais lotes.

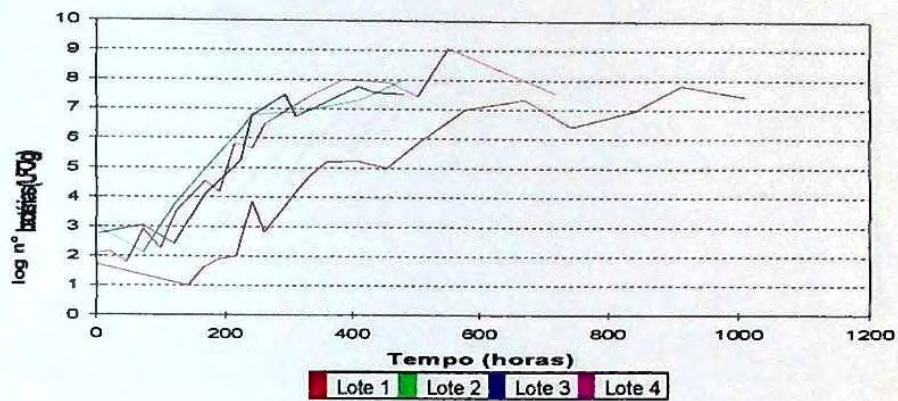


Gráfico 48: Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 12°C.

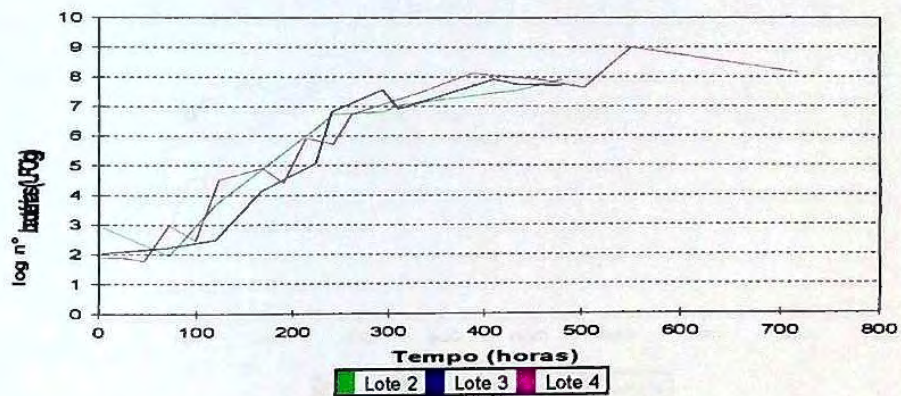


Gráfico 49: Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 12°C.

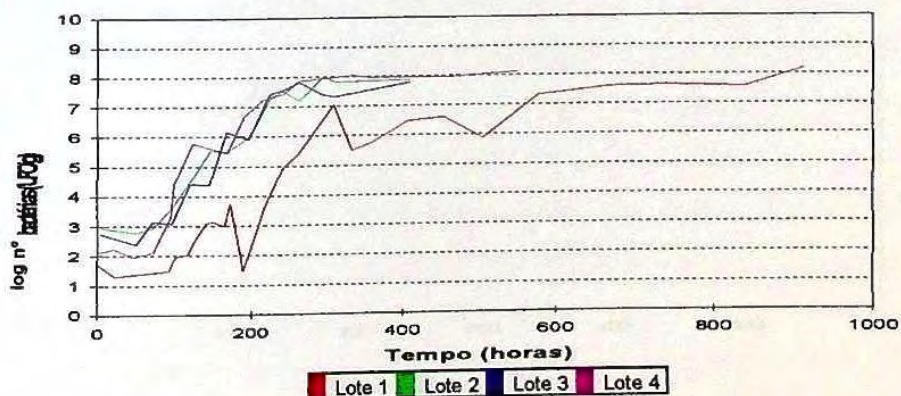


Gráfico 50: Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 16°C.

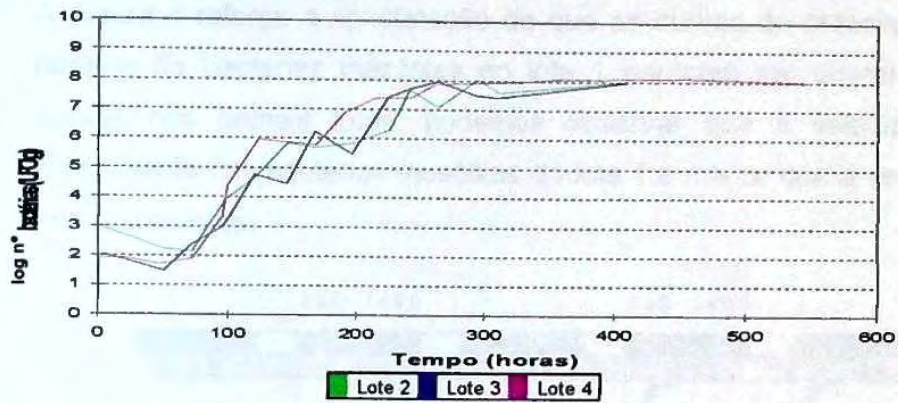


Gráfico 51: Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 16°C.

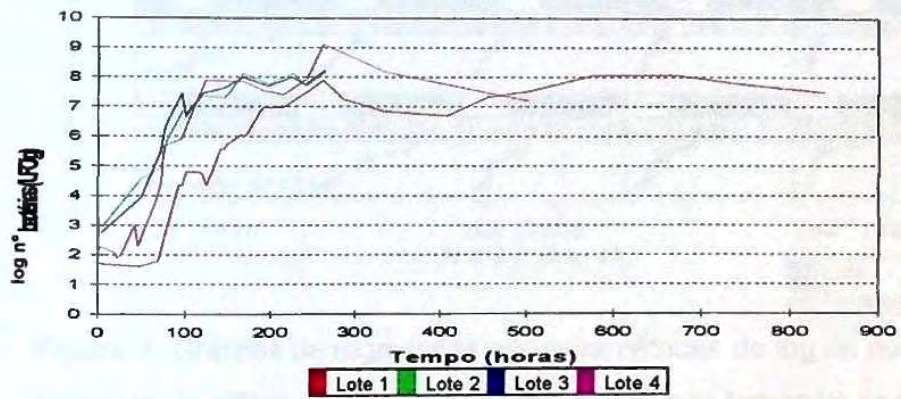


Gráfico 52: Comportamento das bactérias mesófilas em todos os lotes para a temperatura 20°C.

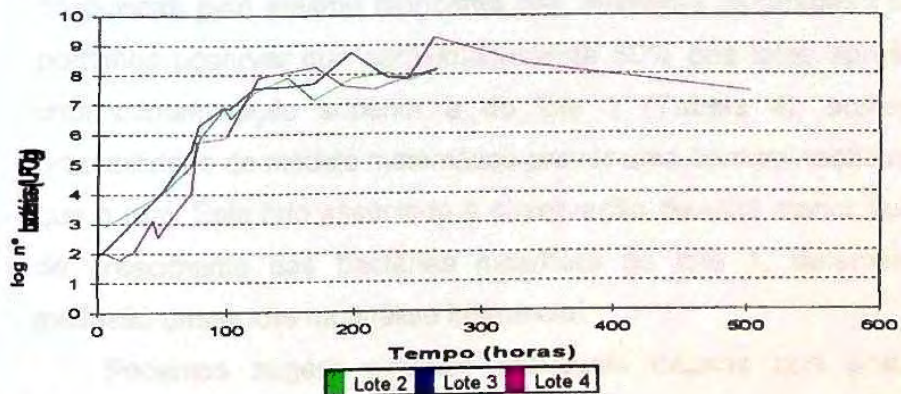


Gráfico 53: Comportamento das bactérias lácticas em todos os lotes para a temperatura 20°C.

A Figura 4 reforça a constatação de que as curvas de crescimento do número de bactérias mesófilas no lote 1 parecem ser diferentes das curvas nos demais lotes: podemos observar que a velocidade de crescimento das bactérias mesófilas do lote 1 é menor que a velocidade nos outros lotes.

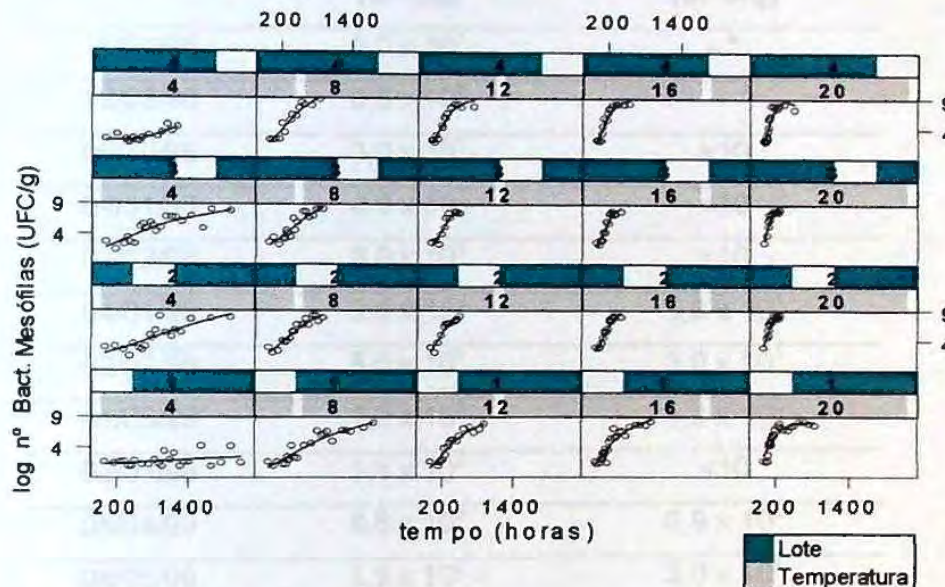


Figura 4: Gráficos de regressões não paramétricas do log do número de bactérias mesófilas em função do tempo, para cada temperatura e lote.

Analisando os dados históricos de contaminação inicial de salsichas produzidas pelo mesmo fabricante das amostras estudadas (Tabela 3) podemos observar que aproximadamente 50% dos lotes apresentaram uma contaminação superior a do lote 1 (Tabela 4), aumentando a probabilidade do modelo matemático prever uma contaminação menor do que a real. Este fato associado a observação de uma menor velocidade de crescimento das bactérias mesófilas no lote 1, determinaram a exclusão desse lote na análise inferencial.

Podemos sugerir algumas prováveis causas que possam ter determinado ou contribuído para uma menor contaminação do lote 1, entre elas: maior eficiência do processo de higienização e carga microbiana da matéria-prima menor que o valor normalmente encontrado.

Tabela 3: Dados históricos de contaminação inicial de salsichas produzidas, no período de janeiro/98 a julho/99.

Data de fabricação	Contagem total de mesófilos (UFC/g)	Contagem de bactérias lácticas (UFC/g)
16/01/98	$3,0 \times 10^1$	- *
12/02/98	$6,0 \times 10^2$	-
06/10/98	$3,0 \times 10^1$	<10
04/11/98	$4,0 \times 10^1$	<10
02/12/98	$3,0 \times 10^1$	<10
04/01/99	$2,8 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$
02/02/99	$5,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$
01/03/99	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$
02/03/99	$1,1 \times 10^2$	<10
05/04/99	$8,8 \times 10^3$	$6,9 \times 10^2$
04/05/99	$1,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$
04/06/99	$7,0 \times 10^1$	<10
02/07/99	$4,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$

* (-) = dado não disponível

Tabela 4: Contaminação inicial dos lotes analisados.

nº do Lote	Contagem total de mesófilos (UFC/g)	Contagem de bactérias lácticas (UFC/g)
1	$5,0 \times 10^1$	- *
2	$8,8 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$
3	$5,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
4	$1,3 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$

* (-) = dado não disponível

Para as bactérias lácticas (Figura 5) observamos que nenhum lote apresenta um comportamento diferenciado dos demais, sendo os níveis de contaminação inicial (Tabela 4) comparáveis com os dados históricos (Tabela 3), e portanto, todos os lotes analisados foram considerados na análise inferencial.

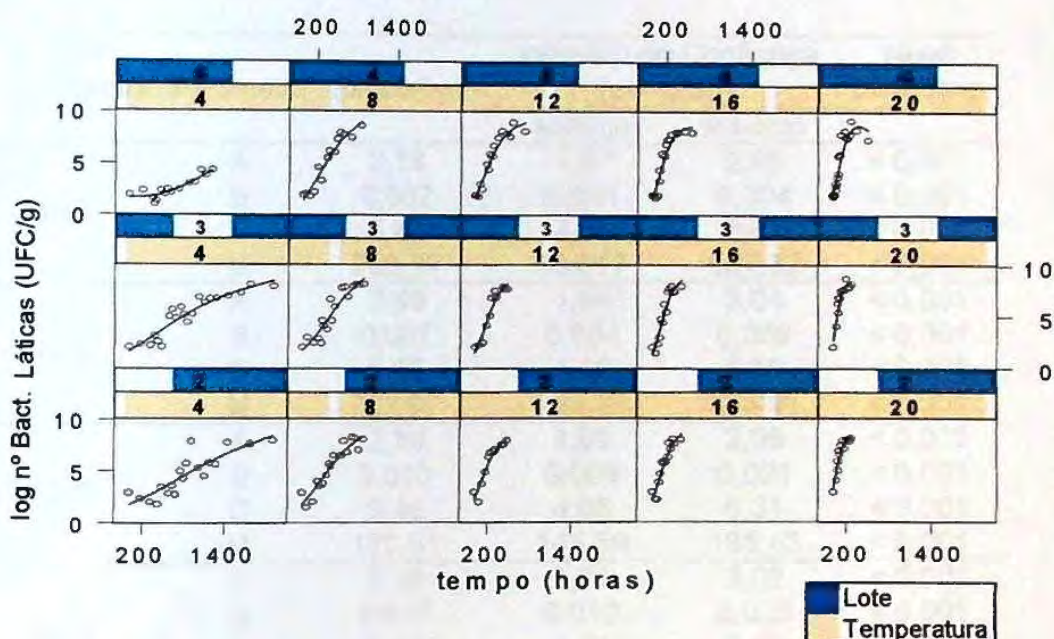


Figura 5: Gráficos de regressões não paramétricas do log do número de bactérias lácticas em função do tempo, para cada temperatura e lote.

5.2 - Resultados e discussão da análise inferencial

5.2.1 - Ajuste e comparação de modelos para descrever a variação do número de bactérias por temperatura

Os resultados do ajuste do modelo de Gompertz modificado para cada temperatura são apresentados nas Tabelas 5 e 6 para bactérias mesófilas e bactérias lácticas, respectivamente. Observamos que os parâmetros A, B, C e M são significativamente diferentes de zero para todas as temperaturas (níveis descritivos inferiores a 0,001). Ou seja,

todos os parâmetros são necessários para descrever a relação entre a variável independente (tempo) e a variável dependente (log do número de bactérias).

Tabela 5: Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias mesófilas, para cada temperatura.

Temperatura	Parâmetro	Estimativa	Intervalo de Confiança ($\gamma = 0,95$)		Nível Descritivo
			Mínimo	Máximo	
4°C	A	2,18	1,57	2,80	< 0,001
	B	0,002	0,001	0,004	< 0,001
	C	5,45	4,08	6,81	< 0,001
	M	780,99	654,17	907,82	< 0,001
8°C	A	2,49	1,94	3,04	< 0,001
	B	0,007	0,004	0,009	< 0,001
	C	5,62	4,68	6,56	< 0,001
	M	332,07	289,23	374,91	< 0,001
12°C	A	2,39	1,83	2,96	< 0,001
	B	0,013	0,008	0,021	< 0,001
	C	5,48	4,66	6,31	< 0,001
	M	170,51	145,59	195,43	< 0,001
16°C	A	2,36	1,71	3,02	< 0,001
	B	0,017	0,010	0,023	< 0,001
	C	5,65	4,71	6,59	< 0,001
	M	122,01	102,39	141,64	< 0,001
20°C	A	2,30	1,73	2,87	< 0,001
	B	0,040	0,026	0,055	< 0,001
	C	5,63	4,94	6,32	< 0,001
	M	62,94	55,02	70,86	< 0,001

Tabela 6: Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias lácticas, para cada temperatura.

Temperatura	Parâmetro	Estimativa	Intervalo de Confiança ($\gamma = 0,95$)		Nível Descritivo
			Mínimo	Máximo	
4°C	A	1,88	1,20	2,57	< 0,001
	B	0,002	0,001	0,003	< 0,001
	C	6,31	4,80	7,83	< 0,001
	M	779,26	655,94	902,58	< 0,001
8°C	A	2,16	1,62	2,70	< 0,001
	B	0,007	0,004	0,009	< 0,001
	C	6,07	5,16	6,98	< 0,001
	M	326,02	287,47	364,56	< 0,001
12°C	A	2,10	1,49	2,71	< 0,001
	B	0,013	0,008	0,018	< 0,001
	C	5,95	5,07	6,83	< 0,001
	M	162,61	137,38	187,84	< 0,001
16°C	A	1,88	1,21	2,54	< 0,001
	B	0,018	0,012	0,024	< 0,001
	C	6,08	5,16	6,99	< 0,001
	M	113,01	95,71	130,29	< 0,001
20°C	A	2,08	1,49	2,66	< 0,001
	B	0,036	0,024	0,048	< 0,001
	C	5,96	5,25	6,68	< 0,001
	M	61,70	53,56	69,84	< 0,001

As Tabelas 7 para as bactérias mesófilas e 8 para as bactérias lácticas apresentam os resultados da comparação dos modelos por temperatura.

Tabela 7: Níveis descritivos dos testes para verificar a existência do efeito de temperatura nos parâmetros do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias mesófilas.

Parâmetro	Temperaturas Comparadas	Nível Descritivo
A	4°C versus 20°C	0,39
	8°C versus 20°C	0,32
	12°C versus 20°C	0,41
	16°C versus 20°C	0,44
B	4°C versus 20°C	< 0,001
	8°C versus 20°C	< 0,001
	12°C versus 20°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	0,002
C	4°C versus 20°C	0,41
	8°C versus 20°C	0,49
	12°C versus 20°C	0,39
	16°C versus 20°C	0,49
M	4°C versus 20°C	< 0,001
	8°C versus 20°C	< 0,001
	12°C versus 20°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	< 0,001

Tabela 8: Níveis descritivos dos testes para verificar a existência do efeito de temperatura nos parâmetros do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias lácticas.

Parâmetro	Temperaturas Comparadas	Nível Descritivo
A	4°C versus 20°C	0,34
	8°C versus 20°C	0,42
	12°C versus 20°C	0,48
	16°C versus 20°C	0,33
B	4°C versus 20°C	< 0,001
	8°C versus 20°C	< 0,001
	12°C versus 20°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	0,003
C	4°C versus 20°C	0,34
	8°C versus 20°C	0,43
	12°C versus 20°C	0,49
	16°C versus 20°C	0,42
M	4°C versus 20°C	< 0,001
	8°C versus 20°C	< 0,001
	12°C versus 20°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	< 0,001

Ao nível de significância de 5% concluímos que, tanto para as bactérias mesófilas quanto para as bactérias lácticas:

- O parâmetro A não é influenciado pela temperatura (níveis descritivos maiores que 0,3), conforme era esperado, visto que este parâmetro representa a contaminação inicial das amostras, ou seja, seu valor é determinado pelas etapas que antecedem o armazenamento.
- O parâmetro C não é influenciado pela temperatura (níveis descritivos maiores que 0,3).
- Os parâmetros B e M são influenciados pela temperatura (níveis descritivos menores igual ou menores que 0,003).

Os resultados do ajuste do modelo de Gompertz modificado, considerando-se os parâmetros A e C comuns para todas as temperaturas são apresentados na Tabela 9 para as bactérias mesófilas, enquanto que para as bactérias lácticas são apresentados na Tabela 10.

Tabela 9: Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias mesófilas, considerando os parâmetros A e C comuns a todas as temperaturas.

Temperatura	Parâmetro	Estimativa	Intervalo de Confiança ($\gamma = 0,95$)		Nível Descritivo
			Mínimo	Máximo	
4°C	A	2,33	2,08	2,59	< 0,001
	B	0,002	0,002	0,003	< 0,001
	C	5,63	5,25	6,01	< 0,001
	M	837,01	764,24	909,76	< 0,001
8°C	A	2,33	2,08	2,59	< 0,001
	B	0,007	0,005	0,009	< 0,001
	C	5,63	5,25	6,01	< 0,001
	M	318,22	288,70	347,75	< 0,001
12°C	A	2,33	2,08	2,59	< 0,001
	B	0,014	0,009	0,018	< 0,001
	C	5,63	5,25	6,01	< 0,001
	M	169,80	150,32	189,29	< 0,001
16°C	A	2,33	2,08	2,59	< 0,001
	B	0,017	0,013	0,022	< 0,001
	C	5,63	5,25	6,01	< 0,001
	M	120,51	107,47	133,56	< 0,001
20°C	A	2,33	2,08	2,59	< 0,001
	B	0,040	0,028	0,053	< 0,001
	C	5,63	5,25	6,01	< 0,001
	M	63,38	57,25	69,52	< 0,001

Tabela 10: Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, para as bactérias lácticas, considerando os parâmetros A e C comuns a todas as temperaturas.

Temperatura	Parâmetro	Estimativa	Intervalo de Confiança ($\gamma = 0,95$)		Nível Descritivo
			Mínimo	Máximo	
4°C	A	2,02	1,76	2,29	< 0,001
	B	0,002	0,002	0,003	< 0,001
	C	6,04	5,67	6,42	< 0,001
	M	787,76	723,50	852,02	< 0,001
8°C	A	2,02	1,76	2,29	< 0,001
	B	0,007	0,005	0,009	< 0,001
	C	6,04	5,67	6,42	< 0,001
	M	314,11	287,28	340,94	< 0,001
12°C	A	2,02	1,76	2,29	< 0,001
	B	0,013	0,009	0,016	< 0,001
	C	6,04	5,67	6,42	< 0,001
	M	160,55	142,07	179,03	< 0,001
16°C	A	2,02	1,76	2,29	< 0,001
	B	0,017	0,013	0,021	< 0,001
	C	6,04	5,67	6,42	< 0,001
	M	117,40	105,50	129,30	< 0,001
20°C	A	2,02	1,76	2,29	< 0,001
	B	0,036	0,026	0,046	< 0,001
	C	6,04	5,67	6,42	< 0,001
	M	61,31	55,20	67,43	< 0,001

Conforme já era esperado, as conclusões sobre os parâmetros B e M se mantiveram, ou seja, são significativamente diferentes de zero para todas as temperaturas (níveis descritivos menores que 0,001).

As Tabelas 11 e 12 (bactérias mesófilas e lácticas, respectivamente) apresentam os resultados de comparações realizadas para verificarmos quais mudanças de temperatura influenciam os parâmetros B e M, considerando A e C comuns para todas as temperaturas.

Tabela 11: Níveis descritivos dos testes para localizar o efeito de temperatura nos parâmetros B e M do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias mesófilas.

Parâmetro	Temperaturas Comparadas	Nível Descritivo
B	4°C versus 8°C	< 0,001
	8°C versus 12°C	< 0,001
	12°C versus 16°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	< 0,001
M	4°C versus 8°C	< 0,001
	8°C versus 12°C	< 0,001
	12°C versus 16°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	< 0,001

Tabela 12: Níveis descritivos dos testes para localizar o efeito de temperatura nos parâmetros B e M do modelo de Gompertz modificado, para o crescimento de bactérias lácticas.

Parâmetro	Temperaturas Comparadas	Nível Descritivo
B	4°C versus 8°C	< 0,001
	8°C versus 12°C	< 0,001
	12°C versus 16°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	< 0,001
M	4°C versus 8°C	< 0,001
	8°C versus 12°C	< 0,001
	12°C versus 16°C	< 0,001
	16°C versus 20°C	< 0,001

Ao nível de significância de 5% concluímos que:

- Os parâmetros B e M sofrem influência em todas as mudanças de temperatura (níveis descritivos inferiores a 0,001).

5.2.2 - Ajuste de funções que relacionam os parâmetros B e M com a temperatura

Nos Gráficos 54 e 55, estão representadas as estimativas do parâmetro B dadas nas tabelas 9 e 10, para bactérias mesófilas e lácticas respectivamente.

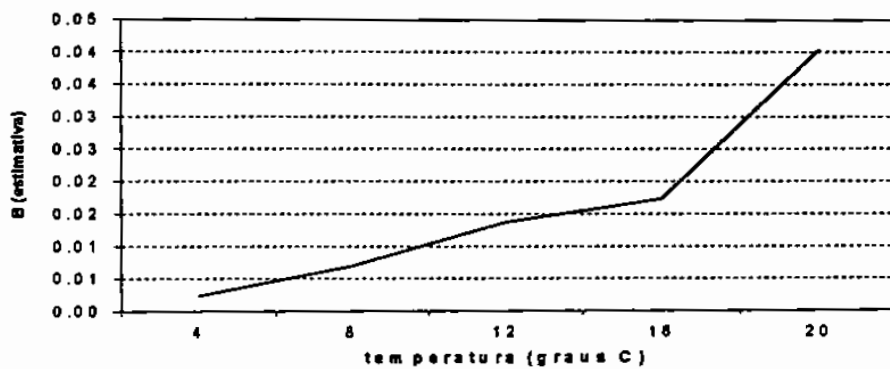


Gráfico 54: Estimativas do parâmetro B em função da temperatura para bactérias mesófilas.

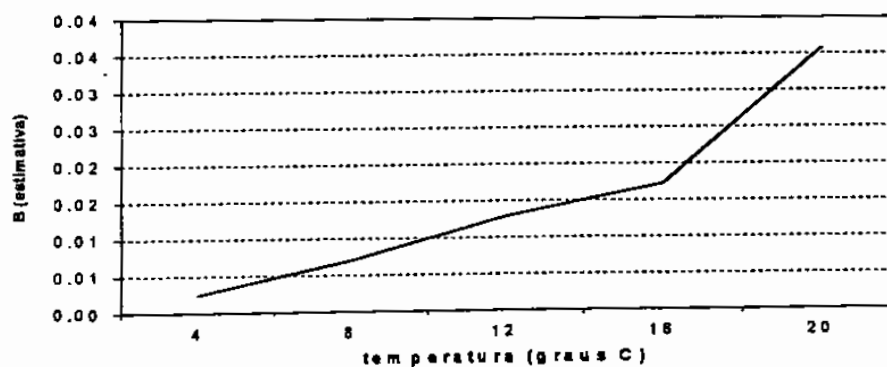


Gráfico 55: Estimativas do parâmetro B em função da temperatura para bactérias lácticas.

Nos Gráficos 56 e 57 estão representados os ajustes das funções Linear, Logarítmica, Quadrática e Exponencial para verificar qual função melhor representa o comportamento do parâmetro B em função da temperatura.

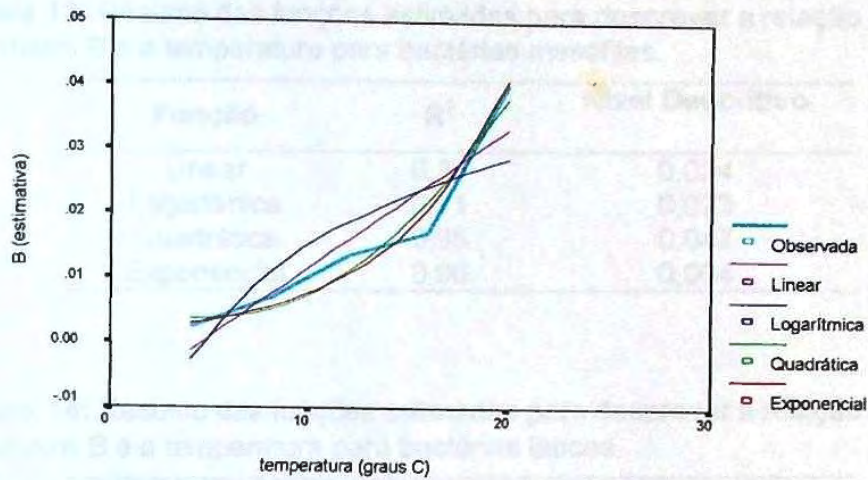


Gráfico 56: Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias mesófilas.

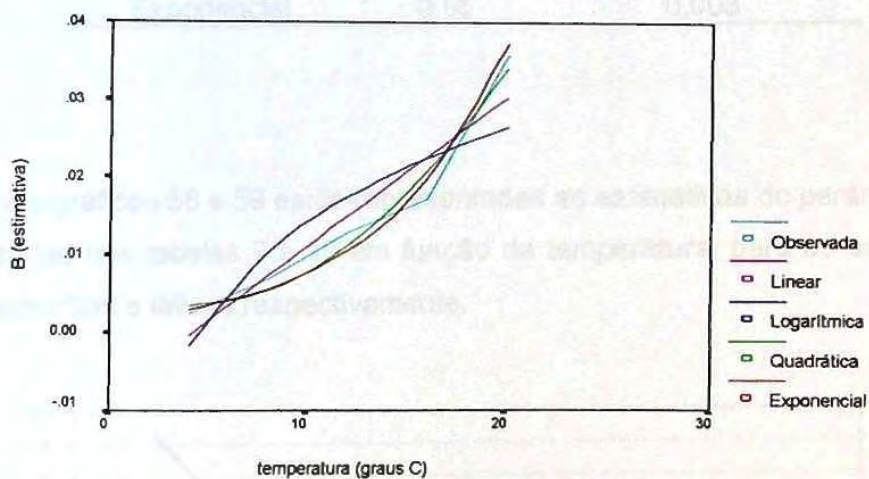


Gráfico 57: Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias lácticas.

Através das Tabelas 13 (bactérias mesófilas) e 14 (bactérias lácticas), podemos concluir que a função que melhor representa o comportamento do parâmetro B em função da temperatura é a exponencial – equação 20 (nível descritivo 0,004 para bactérias mesófilas e 0,003 para bactérias lácticas e coeficiente de explicação 0,96 para mesófilas e lácticas).

Tabela 13: Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias mesófilas.

Função	R ²	Nível Descritivo
Linear	0,86	0,024
Logarítmica	0,71	0,073
Quadrática	0,95	0,047
Exponencial	0,96	0,004

Tabela 14: Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro B e a temperatura para bactérias lácticas.

Função	R ²	Nível Descritivo
Linear	0,89	0,016
Logarítmica	0,75	0,058
Quadrática	0,97	0,033
Exponencial	0,96	0,003

Nos gráficos 58 e 59 estão representadas as estimativas do parâmetro M dadas nas tabelas 9 e 10 em função da temperatura, para as bactérias mesófilas e lácticas respectivamente.

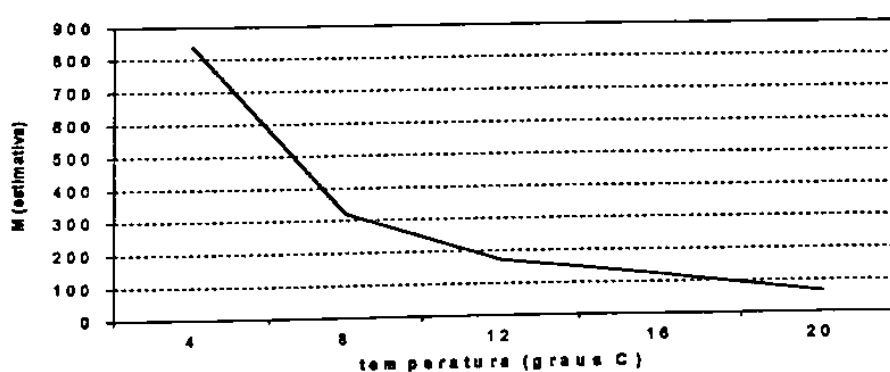


Gráfico 58: Estimativas do parâmetro M em função da temperatura para bactérias mesófilas.

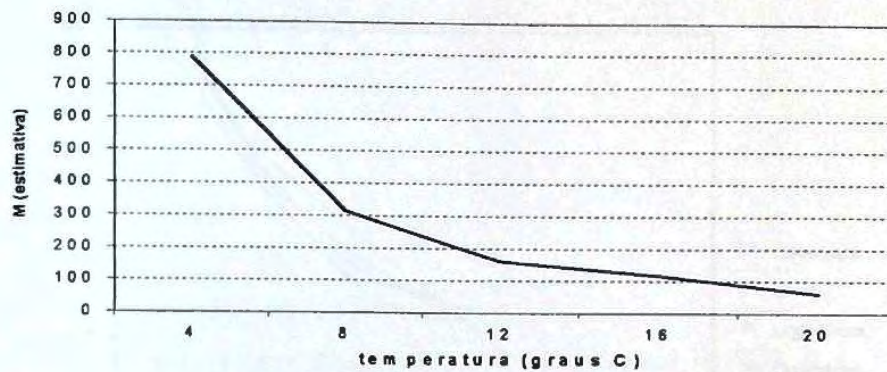


Gráfico 59: Estimativas do parâmetro M em função da temperatura para bactérias lácticas.

Nos Gráficos 60 e 61, para bactérias mesófilas e lácticas, respectivamente, estão representados os ajustes das funções Linear, Logarítmica, Quadrática e Exponencial para verificar qual função melhor representa o comportamento do parâmetro M em função da temperatura.

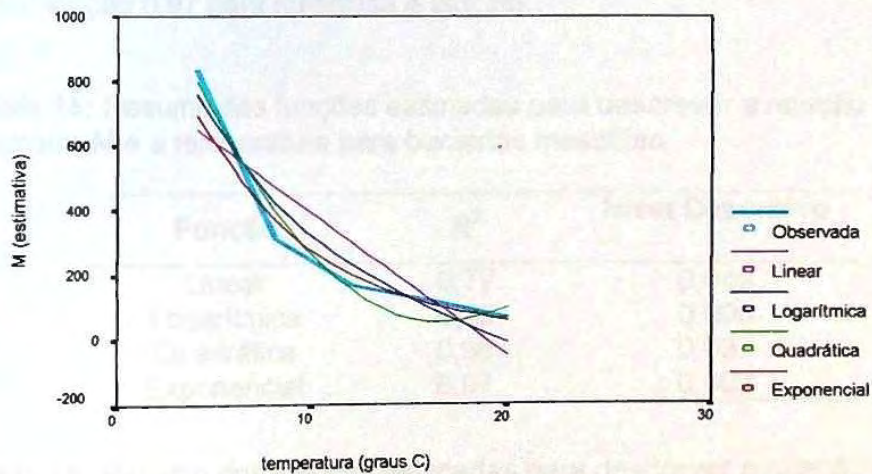


Gráfico 60: Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias mesófilas.

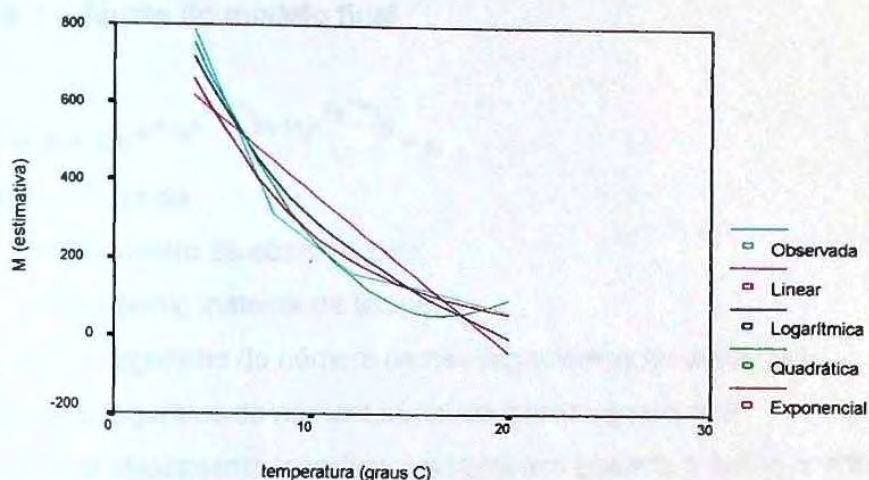


Gráfico 61: Gráfico das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias lácticas.

Através dos resultados das Tabelas 15 (bactérias mesófilas) e 16 (bactérias lácticas), podemos concluir que a função que melhor representa esse comportamento é a função exponencial - equação 21 (nível descritivo 0,002 para bactérias mesófilas e lácticas e coeficiente de explicação 0,97 para mesófilas e lácticas).

Tabela 15: Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias mesófilas.

Função	R ²	Nível Descritivo
Linear	0,77	0,049
Logarítmica	0,93	0,008
Quadrática	0,96	0,037
Exponencial	0,97	0,002

Tabela 16: Resumo das funções estimadas para descrever a relação entre o parâmetro M e a temperatura para bactérias lácticas.

Função	R ²	Nível Descritivo
Linear	0,78	0,046
Logarítmica	0,94	0,007
Quadrática	0,97	0,032
Exponencial	0,97	0,002

5.2.3 – Ajuste do modelo final

$$Y_i = A + Ce^{-\{g_0 e^{g_1 \cdot w_i} (t_i - \{g_2 e^{g_3 \cdot w_i}\})\}} + \varepsilon_i \quad (22)$$

$i = 1, \dots, n$, onde

- n é o número de observações;
- t_i é o i -ésimo instante de tempo;
- Y_i é o logaritmo do número de microrganismos no instante t_i ;
- A é o logaritmo do número inicial de microrganismos;
- C é o crescimento logarítmico assintótico quando t tende a infinito;
- ε_i é o erro não observável correspondente à i -ésima observação;
- w_i é a temperatura observada no instante t_i ;
- g_0, g_1, g_2 e g_3 são parâmetros a serem estimados.

Os resultados do ajuste do modelo acima para as bactérias mesófilas encontram-se na Tabela 17 e, para as bactérias lácticas, na Tabela 18.

Tabela 17: Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, com os parâmetros B e M substituídos pela função exponencial, para as bactérias mesófilas.

Parâmetro	Estimativa	Intervalo de Confiança ($\gamma = 0,95$)		Nível Descritivo
		Mínimo	Máximo	
A	2,35	2,04	2,65	< 0,001
C	5,54	5,09	5,98	< 0,001
g_0	0,002	0,001	0,002	< 0,001
g_1	0,16	0,14	0,19	< 0,001
g_2	1314,61	1166,13	1463,09	< 0,001
g_3	-0,16	-0,16	-0,15	< 0,001

Tabela 18: Valores ajustados do modelo de Gompertz modificado, com os parâmetros B e M substituídos pela função exponencial, para as bactérias láticas.

Parâmetro	Estimativa	Intervalo de Confiança ($\gamma = 0,95$)		Nível Descritivo
		Mínimo	Máximo	
A	2,04	1,72	2,35	< 0,001
C	5,95	5,50	6,39	< 0,001
g_0	0,002	0,001	0,002	< 0,001
g_1	0,16	0,14	0,18	< 0,001
g_2	1256,17	1122,54	1389,80	< 0,001
g_3	-0,16	-0,16	-0,15	< 0,001

Ao nível de significância de 5% concluímos que:

- Todos os parâmetros do modelo são considerados significantes (nível descritivo menor que 0,001 tanto para bactérias mesófilas quanto para láticas).

Sendo assim, o modelo final ajustado para bactérias mesófilas é:

$$Y_i = 2,35 + 5,54 e^{-\left\{0,002e^{0,16 \cdot w_i}\right\} \left(t_i - (1314,81e^{-0,16 \cdot w_i})\right)} + \varepsilon_i \quad (23)$$

E para bactérias láticas:

$$Y_i = 2,04 + 5,95 e^{-\left\{0,002e^{0,16 \cdot w_i}\right\} \left(t_i - (1256,17e^{-0,16 \cdot w_i})\right)} + \varepsilon_i \quad (24)$$

Sendo o parâmetro A o logaritmo do número inicial de microrganismos, a estimativa de contaminação inicial das amostras é de $2,24 \times 10^2$ UFC/g para bactérias mesófilas e de $1,10 \times 10^2$ UFC/g para bactérias láticas.

A estimativa da população máxima das amostras, conforme a equação 6 é de $7,76 \times 10^7$ UFC/g para bactérias mesófilas e de $9,77 \times 10^7$ UFC/g para bactérias láticas.

A partir do modelo final ajustado, equações 23 e 24, para bactérias mesófilas e bactérias láticas respectivamente, as estimativas da velocidade de crescimento exponencial (considerando a equação 3),

tempo de geração (considerando a equação 4) e tempo da fase lag (considerando a equação 5), para essas bactérias, em função da temperatura são as apresentadas nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19: Estimativas da velocidade de crescimento exponencial, tempo de geração e tempo de fase lag das bactérias mesófilas.

Temperatura	Velocidade de crescimento exponencial [log(UFC/g)]/h	Tempo de geração (horas)	Tempo de duração da fase lag (dias)
4°C	0,0077	38,87	17,9
8°C	0,0147	20,51	9,5
12°C	0,0277	10,86	4,9
16°C	0,0528	5,70	2,6
20°C	0,1001	3,01	1,4

Tabela 20: Estimativas da velocidade de crescimento exponencial, tempo de geração e tempo de fase lag das bactérias lácticas.

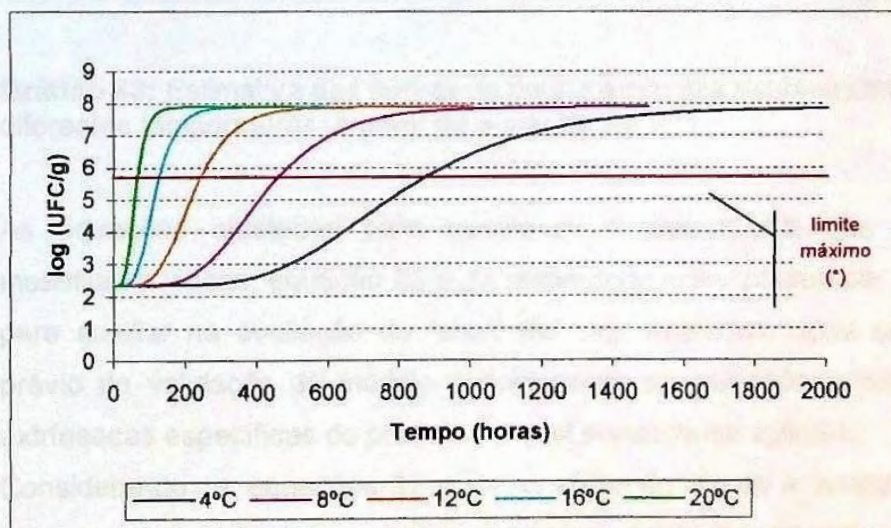
Temperatura	Velocidade de crescimento exponencial [log(UFC/g)]/h	Tempo de geração (horas)	Tempo de duração da fase lag (dias)
4°C	0,0083	36,19	16,6
8°C	0,0158	19,10	8,7
12°C	0,0298	10,11	4,6
16°C	0,0567	5,31	2,5
20°C	0,1075	2,80	1,3

Considerando os parâmetros de qualidade citados na Tabela 2, onde consta como limite máximo para a Contagem Total de Mesófilos o valor de $5,0 \times 10^5$ UFC/g, a estimativa da manutenção da qualidade das salsichas estocadas nas temperaturas estudadas, seria conforme Tabela 21, o que também pode

ser observado através das estimativas das curvas de crescimento das bactéria mesófilas (Gráfico 62).

Tabela 21: Estimativa da manutenção da qualidade das salsichas, considerando como parâmetro o limite máximo de Contagem Total de Mesófilos ($5,0 \times 10^5$ UFC/g) estabelecido por uma empresa de alimentos do Brasil.

Temperatura	Tempo de manutenção da qualidade (dias)
4°C	36,4
8°C	19,2
12°C	10,1
16°C	5,3
20°C	2,8



(*) Limite máximo de Contagem Total de Mesófilos = $5,0 \times 10^5$ UFC/g, estabelecido por uma empresa de alimentos do Brasil.

Gráfico 62: Estimativa das curvas de crescimento das bactérias mesófilas para diferentes temperaturas, a partir da equação 23.

Apesar de não estar definido um limite máximo para as bactérias lácticas, o conhecimento do comportamento destas bactérias é fundamental pois, conforme dados de literatura, as bactérias lácticas desempenham um papel fundamental no processo de deterioração das salsichas embaladas à vácuo (HOLY et al., 1991). A partir da equação 24, a estimativa das curvas de crescimento das bactérias lácticas seriam conforme Gráfico 63.

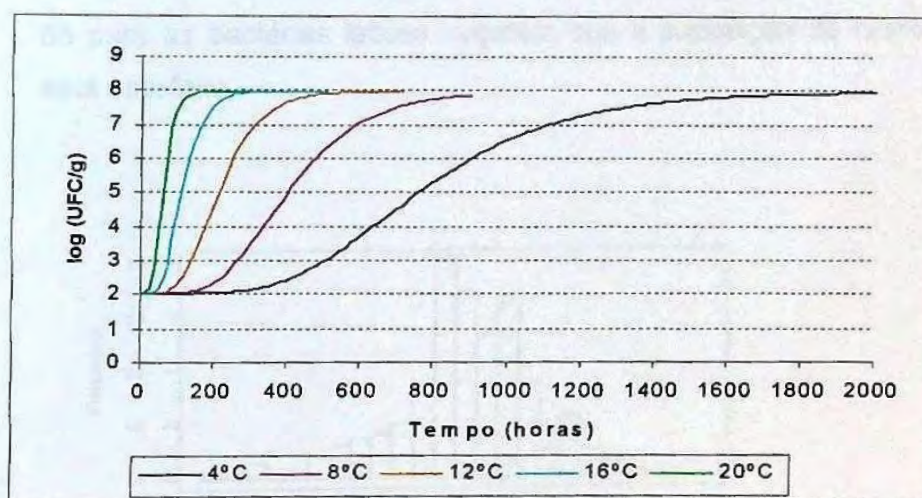


Gráfico 63: Estimativa das curvas de crescimento das bactérias lácticas para diferentes temperaturas, a partir da equação 24.

As equações ajustadas para descrever o crescimento das bactérias mesófilas e lácticas, equação 23 e 24 respectivamente, podem ser utilizadas para auxiliar na avaliação do "shelf life" das salsichas, após um estudo prévio de validação do modelo considerando as condições intrínsecas e extrínsecas específicas do produto ao qual pretende-se aplicá-lo.

Considerando as equações 23 e 24, o efeito do tempo e temperatura de estocagem de salsichas, sobre o número de bactérias mesófilas e lácticas resulta nas tabelas A e B do apêndice, respectivamente.

5.3 Resultados e discussão do teste das suposições do modelo

5.3.1 $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$

Para verificar se as suposições de **normalidade** e **homocedasticidade** assumidas pelo modelo eram satisfeitas, foi realizada uma análise de resíduos. O histograma dos resíduos (Figura 6) e o Gráfico 64 para as bactérias mesófilas, e o histograma dos resíduos (Figura 7) e o Gráfico 65 para as bactérias lácticas sugerem que a suposição de normalidade está satisfeita.

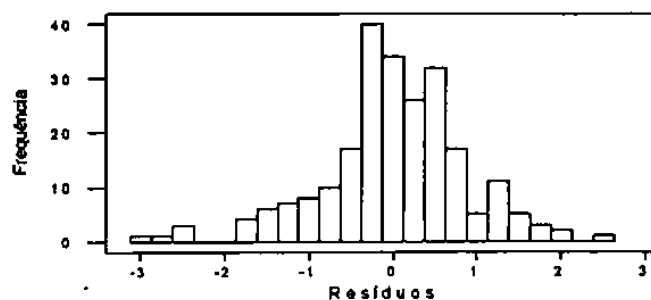


Figura 6: Histograma dos resíduos do modelo final para bactérias mesófilas.

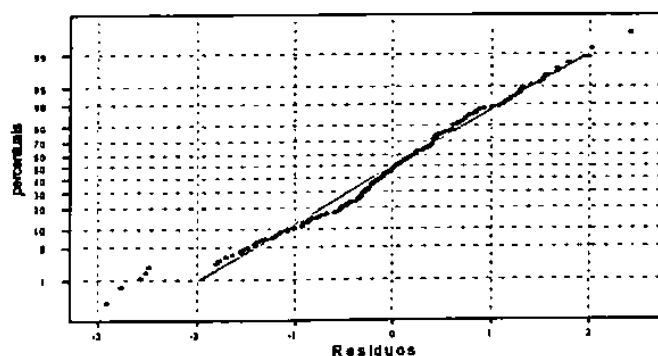


Gráfico 64: Gráfico de probabilidades normal dos resíduos do modelo final para bactérias mesófilas.

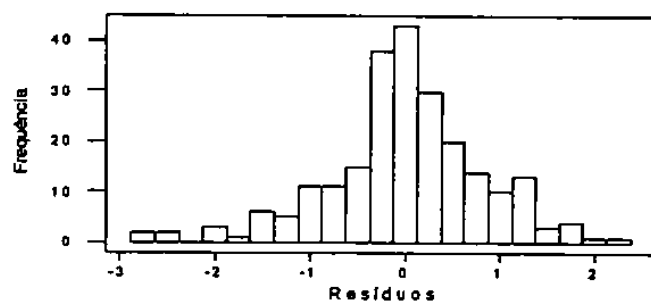


Figura 7: Histograma dos resíduos do modelo final para bactérias lácticas.

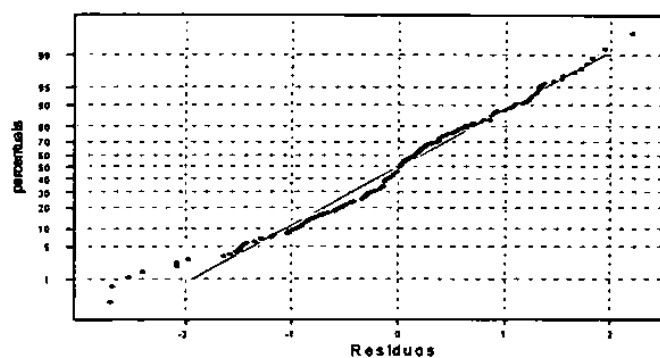


Gráfico 65: Gráfico de probabilidades normal dos resíduos do modelo final para bactérias lácticas.

Os Gráficos 66 e 67 para bactérias mesófilas e lácticas, respectivamente, sugerem que a suposição de homocedasticidade está satisfeita, embora seja notada a presença de alguns pontos discrepantes.

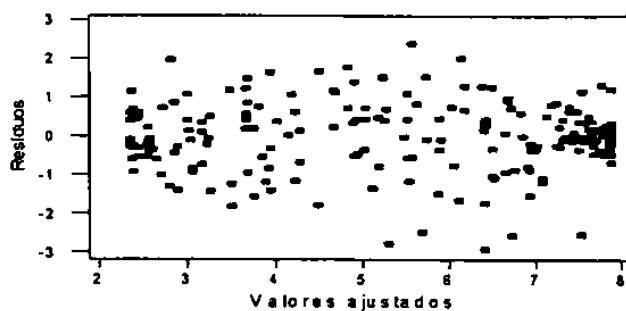


Gráfico 66: Gráfico dos resíduos em função do logaritmo do número de bactérias mesófilas previsto pelo modelo final.

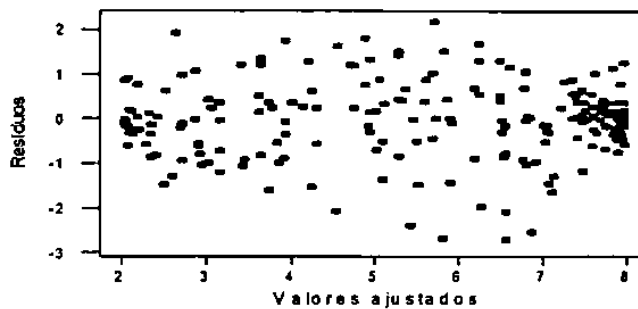


Gráfico 67: Gráfico dos resíduos em função do logaritmo do número de bactérias lácticas previsto pelo modelo final.

5.3.2 Independência das observações

Para ajustarmos os modelos matemáticos para o crescimento de bactérias mesófilas e bactérias lácticas em salsichas armazenadas a diferentes temperaturas, foi suposta a independência das observações. Todavia, no experimento tem-se a presença de medidas repetidas, pois amostras do mesmo lote foram analisadas ao longo do tempo e a diferentes temperaturas. Este fato pode ocasionar na falta de independência entre as observações feitas em amostras provenientes de um mesmo lote.

O número de lotes utilizados no experimento impede que técnicas de análise estatística que levem em consideração uma estrutura de correlação entre as observações seja utilizada. A utilização dessas técnicas, entretanto, não afetariam as conclusões obtidas, uma vez que os níveis descritivos dos parâmetros, apresentados nas tabelas 17 e 18, são suficientemente distantes dos níveis de significância usuais (0,05).

5.4 Resultados e discussão dos intervalos de confiança

Os intervalos de confiança das estimativas do logaritmo do número de bactérias mesófilas em função das variáveis independentes tempo e temperatura foram obtidos conforme a equação 25, descrita a seguir (HUET et al., 1996).

$$\hat{f}(x_0, \theta) \pm 1,96 * S_j \quad (25)$$

Onde:

\hat{f}

$\hat{f}(x_0, \theta)$ = valor estimado pelo modelo a um dado tempo e temperatura

\hat{S}_j

\hat{S}_j = desvio padrão médio da previsão

1,96 = valor que confere ao intervalo de confiança o coeficiente de confiança de 0,95

O valor do \hat{S}_j é calculado através da equação 26 descrita a seguir.

$$\hat{S}_j = \sqrt{\hat{\sigma}^2 + s^2} \quad (26)$$

Onde:

$\hat{\sigma}^2$

$\hat{\sigma}^2$ = variância média ao quadrado do modelo, calcula a partir dos dados de derivação do modelo

\hat{s}^2 = desvio padrão médio ao quadrado da previsão do modelo

O valor de \hat{s}^2 é calculado através da equação 27 descrita a seguir.

$$\hat{s}^2 = \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 \frac{df}{d\theta_i} \frac{df}{d\theta_j} V_{ij} \quad (27)$$

Onde :

$$\sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 \frac{df}{d\theta_i} \frac{df}{d\theta_j} = \text{somatória das derivadas da função em relação aos parâmetros } B, M, g_0, g_1, g_2, g_3, \text{ para cada tempo/temperatura}$$

V_{ij} = valor obtido através da matriz de variância e covariância (Tabela 22) das estimativas dos parâmetros, correspondente a cada combinação dos parâmetros considerados para a derivação da função

O valor $\hat{\sigma}^2$ para bactérias mesófilas, a partir dos dados considerados para derivar o modelo, é de 0,7408.

Tabela 22: Matriz de variâncias e covariâncias das estimativas dos parâmetros B, M, g_0 , g_1 , g_2 , g_3 para bactérias mesófilas.

$$\hat{V}_{ij} = \begin{bmatrix} 0,024 & -0,028 & 0,000 & -0,000 & 5,745 & -0,000 \\ -0,028 & 0,052 & -0,000 & -0,000 & -3,669 & 0,000 \\ 0,000 & -0,000 & 0,000 & -0,000 & 0,004 & -0,000 \\ -0,000 & -0,000 & -0,000 & 0,000 & -0,210 & 0,000 \\ 5,745 & -3,669 & 0,004 & -0,210 & 5751,706 & -0,236 \\ -0,000 & 0,000 & -0,000 & 0,000 & -0,236 & 0,000 \end{bmatrix}$$

Os intervalos de confiança ($\gamma = 0,95$) das estimativas do logaritmo do número de bactérias mesófilas, obtidos a partir da equação 25, para cada

combinação das variáveis independentes tempo e temperatura selecionados conforme critério descrito na seção 4.2.3.5 constam na Tabela 23.

Tabela 23: Intervalos de confiança ($\gamma = 0,95$) das estimativas do logaritmo do número de bactérias mesófilas calculadas a partir da equação 23.

Temp. (°C)	Tempo		Valor Estimado (log UFC/g)	Fase de crescimento	Intervalo de confiança (log UFC/g)	
	(dias)	(horas)				
4	9	216	2,3617	lag	0,6535	a 4,0699
4	33	792	5,1399	log	3,4489	a 6,8309
8	5	120	2,3655	lag	0,6599	a 4,0713
8	17	408	5,0004	log	3,3237	a 6,6771
12	2	48	2,3541	lag	0,6454	a 4,0627
12	9	216	5,0212	log	3,3667	a 6,6757
12	29	696	7,8842	estacionária	6,1757	a 9,5926
16	1	24	2,3541	lag	0,6433	a 4,0649
16	5	120	5,3263	log	3,7021	a 6,9505
16	17	408	7,8882	estacionária	6,1789	a 9,5975
20	0,5	12	2,3522	lag	0,6395	a 4,0649
20	2,5	60	5,0212	log	3,4417	a 6,6007
20	8	192	7,8837	estacionária	6,1746	a 9,5928

Na Tabela 24 a seguir podemos observar os valores dos intervalos de confiança citados na tabela 23, transformado em UFC/g.

Tabela 24: Intervalos de confiança ($\gamma = 0,95$) das estimativas do número de bactérias mesófilas (UFC/g) calculadas a partir dos dados da Tabela 23.

Temp. (°C)	Tempo (dias)	Tempo (horas)	fase de crescimento	Valor Estimado (log UFC/g)	intervalo de confiança (UFC/g)
4	9	216	lag	2,3617	4,50E+00 a 1,17E+04
4	33	792	log	5,1399	2,81E+03 a 6,78E+06
8	5	120	lag	2,3655	4,57E+00 a 1,18E+04
8	17	408	log	5,0004	2,11E+03 a 4,75E+06
12	2	48	lag	2,3541	4,42E+00 a 1,16E+04
12	9	216	log	5,0212	2,33E+03 a 4,74E+06
12	29	696	estacionária	7,8842	1,50E+06 a 3,91E+09
16	1	24	lag	2,3541	4,40E+00 a 1,16E+04
16	5	120	log	5,3263	5,04E+03 a 8,92E+06
16	17	408	estacionária	7,8882	1,51E+06 a 3,96E+09
20	0,5	12	lag	2,3522	4,36E+00 a 1,16E+04
20	2,5	60	log	5,0212	2,76E+03 a 3,99E+06
20	8	192	estacionária	7,8837	1,49E+06 a 3,92E+09

Os dados da Tabela 24, indicam intervalos de confiança com uma faixa de variação muito grande, conferindo ao modelo uma baixa capacidade de previsão.

Os intervalos de confiança para as previsões do logaritmo do número de bactérias lácticas a partir da equação 24 não foram calculados, pois os dados do trabalho indicam que estes intervalos são muito próximos aos apresentados na Tabela 23 e portanto não apresentam uma aplicação prática.

5.5 Resultados e discussão da validação dos modelos

Os valores dos conjuntos de dados levantados para a validação dos modelos (equações 23 e 24) constam das Tabelas 25 e 26, para bactérias mesófilas e lácticas respectivamente.

Tabela 25: Dados para validação do modelo ajustado para descrever o crescimento de bactérias mesófilas em função do tempo e temperatura (equação 23).

TEMP.	TEMPO		ESTIMADOS (*) (UFC/g)
	ARMAZENAMENTO (h)	OBSERVADOS (UFC/g)	
4°C	0	3,10E+02	2,20E+02
	461	1,20E+02	7,00E+02
	725	1,00E+03	4,30E+04
	964	1,30E+07	1,70E+06
8°C	120	3,00E+01	2,30E+02
	388	3,00E+05	5,20E+04
	629	1,60E+08	1,30E+07
	845	9,60E+07	5,20E+07
12°C	120	2,40E+04	5,30E+02
	219	1,50E+07	1,30E+05
	461	1,90E+08	5,60E+07
16°C	120	3,00E+07	2,10E+05
	219	2,70E+08	4,30E+07
20°C	48	2,00E+03	6,90E+03
	120	2,30E+08	4,80E+07

(*) valores estimados a partir da equação 23.

Tabela 26: Dados para validação do modelo ajustado para descrever o crescimento de bactérias lácticas em função do tempo e temperatura (equação 24).

TEMP.	TEMPO ARMAZENAMENTO (h)	OBSERVADOS (UFC/g)	ESTIMADOS (*) (UFC/g)
4°C	725	6,20E+02	5,50E+04
	964	2,70E+07	2,30E+06
8°C	120	1,00E+01	1,20E+02
	388	2,00E+05	6,80E+04
	629	2,10E+08	1,80E+07
	845	1,80E+07	6,70E+07
12°C	120	1,80E+04	3,80E+02
	219	1,20E+07	1,70E+05
	461	2,40E+07	7,20E+07
16°C	120	1,50E+07	2,90E+05
	219	1,20E+08	5,50E+07
20°C	48	1,00E+03	7,70E+03
	120	5,10E+08	6,20E+07

(*) valores estimados a partir da equação 24.

O valores do quadrado médio residual (MSE), calculado a partir dos dados de derivação dos modelos e do quadrado médio do erro de previsão (MSPR), calculado conforme descrito na seção 2.1.3.4 a partir dos dados constantes nas Tabelas 25 e 26 para bactérias mesófilas e lácticas respectivamente, constam da Tabela 27 a seguir.

Tabela 27: Valores de MSE e MSPR para os modelos ajustados para descrever o crescimento de bactérias mesófilas (equação 23) e bactérias lácticas (equação 24).

Bactérias mesófilas		Bactérias lácticas	
MSE	MSPR	MSE	MSPR
0,7408	1,3354	0,7219	1,4545

Pode-se observar na Tabela 27 que o valor de MSPR (quadrado médio do erro de previsão) não apresenta uma grande diferença em relação ao valor MSE (quadrado médio residual) (NETER et al., 1996 b) tanto para bactérias mesófilas quanto para bactérias lácticas. Isto indica que não existe uma grande influência de uma nova previsão sobre o valor de MSE e portanto este valor fornece uma indicação apropriada da habilidade preditiva dos modelos (equações 23 e 24).

Para avaliar a validade dos modelos ajustados também foi calculado, a partir dos dados observados e estimados constantes nas Tabelas 25 e 26, o coeficiente de correlação linear de Pearson, tanto para bactérias mesófilas quanto para bactérias lácticas. Os resultados encontram-se na Tabela 28 a seguir.

Tabela 28: Coeficiente de correlação linear de Pearson para bactérias mesófilas e bactérias lácticas.

Tipo de bactéria	Coeficiente de Correlação Linear de Pearson
Bactérias mesófilas	0,92
Bactérias lácticas	0,87

A validade dos modelos também pode ser observada através dos gráficos de correlação apresentados a seguir (Gráficos 68 e 69), obtidos a partir dos dados observados e estimados constantes nas tabelas 25 e 26, para bactérias mesófilas e lácticas respectivamente.

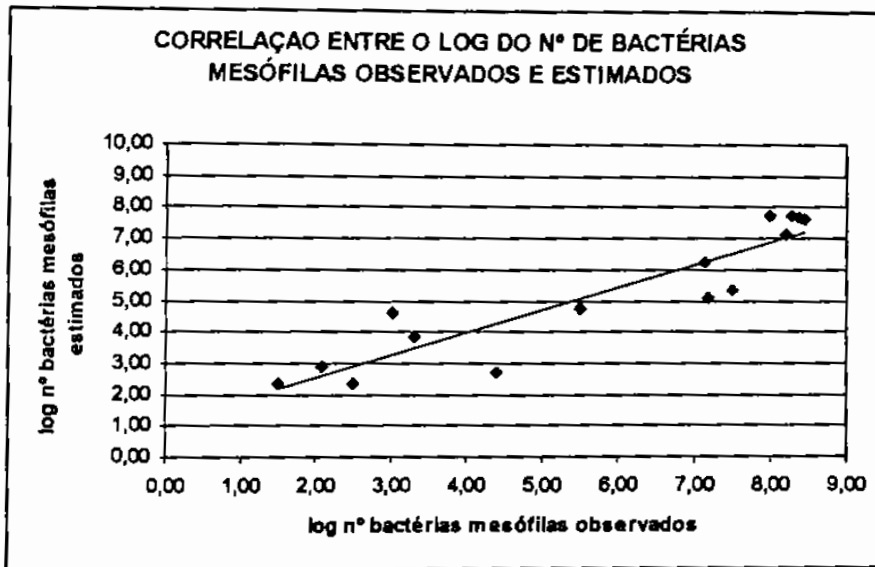


Gráfico 68: Gráfico de correlação dos valores do log do número de bactérias mesófilas observados e estimados.

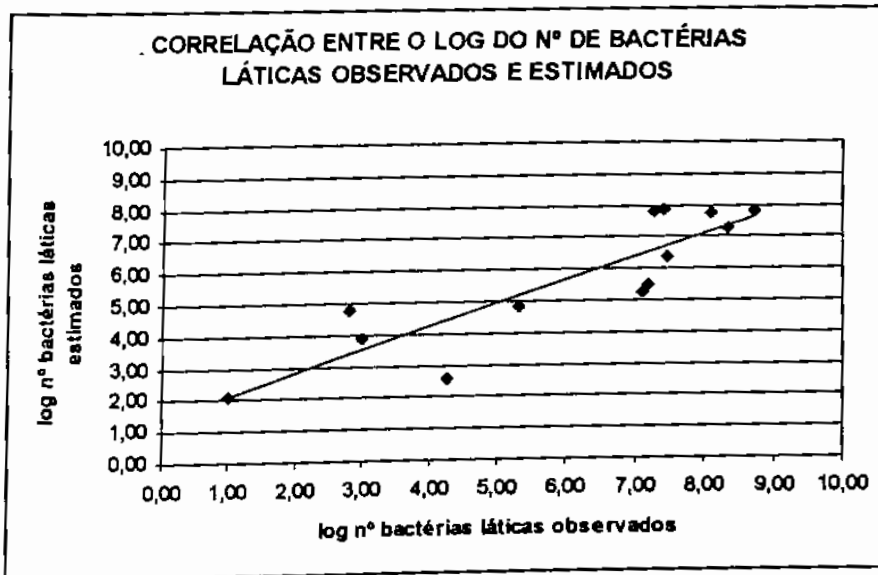


Gráfico 69: Gráfico de correlação dos valores do log do número de bactérias lácticas observados e estimados.

6. CONCLUSÕES

Em função dos dados obtidos por este trabalho, as conclusões são as seguintes:

- O modelo de Gompertz modificado, ajustado para descrever o comportamento da variação do número de bactérias mesófilas em salsichas, em função do tempo e da temperatura é:

$$Y_i = 2,35 + 5,54 e^{-\left\{ 0,002 e^{0,16 w_i} \right\} (t_i - (1314,61 e^{-0,16 w_i}))} + \varepsilon_i$$

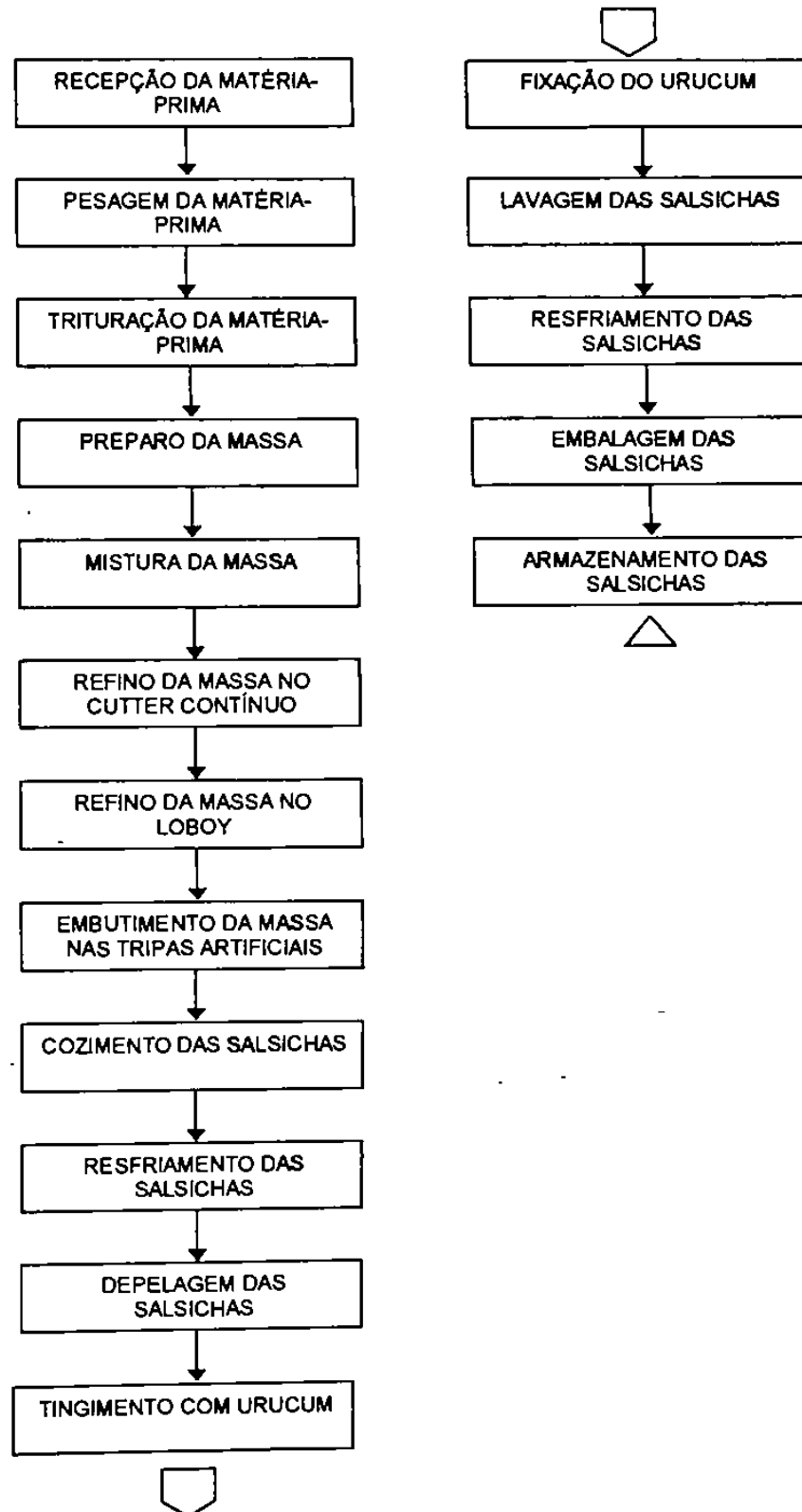
- O modelo de Gompertz modificado, ajustado para descrever o comportamento da variação do número de bactérias lácticas em salsichas, em função do tempo e da temperatura é:

$$Y_i = 2,04 + 5,95 e^{-\left\{ 0,002 e^{0,16 w_i} \right\} (t_i - (1256,17 e^{-0,16 w_i}))} + \varepsilon_i$$

$i = 1, \dots, n$, onde

- n é o número de observações;
- t_i é o i -ésimo instante de tempo;
- Y_i é o logaritmo do número de microrganismos no instante t_i ;
- ε_i é o erro não observável correspondente à i -ésima observação;
- w_i é a temperatura observada no instante t_i ;

- Em relação à avaliação da capacidade preditiva dos modelos, os resultados de intervalo de confiança indicam uma “baixa” habilidade preditiva. No entanto, o fato dos valores de MSE (quadrado médio residual) e MSPR (quadrado médio do erro de previsão), serem próximos, tanto para bactérias mesófilas quanto para bactérias lácticas, podemos considerar o valor de MSE como um indicador válido da habilidade preditiva do modelo.
- Os valores do coeficiente linear de Pearson, assim como os gráficos de correlação, indicam que os modelos de regressão ajustados são adequados para descrever o crescimento de bactérias mesófilas e bactérias lácticas em salsichas.

7. Apêndice A: Fluxograma do processo de produção das salsichas.

8. Apêndice B: Tabelas de previsão.

Tabela A: Densidades de bactérias mesófilas (UFC/g), em salsichas armazenadas em diferentes temperaturas, calculadas a partir do modelo ajustado (equação 23).

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
0	2,24E+02	2,24E+02	2,24E+02	2,24E+02	2,24E+02
0,5	2,24E+02	2,24E+02	2,24E+02	2,24E+02	2,25E+02
1	2,24E+02	2,24E+02	2,24E+02	2,26E+02	2,67E+02
1,5	2,24E+02	2,24E+02	2,24E+02	2,36E+02	7,36E+02
2	2,24E+02	2,24E+02	2,26E+02	2,82E+02	6,86E+03
2,5	2,24E+02	2,24E+02	2,30E+02	4,40E+02	1,05E+05
3	2,24E+02	2,25E+02	2,41E+02	9,83E+02	1,11E+06
3,5	2,24E+02	2,25E+02	2,62E+02	3,11E+03	5,96E+06
4	2,24E+02	2,27E+02	3,04E+02	1,24E+04	1,74E+07
4,5	2,24E+02	2,29E+02	3,83E+02	5,28E+04	3,31E+07
5	2,24E+02	2,32E+02	5,33E+02	2,12E+05	4,80E+07
5,5	2,24E+02	2,38E+02	8,21E+02	7,30E+05	5,93E+07
6	2,25E+02	2,46E+02	1,40E+03	2,08E+06	6,68E+07
6,5	2,25E+02	2,57E+02	2,61E+03	4,87E+06	7,14E+07
7	2,26E+02	2,74E+02	5,21E+03	9,57E+06	7,41E+07
7,5	2,26E+02	2,98E+02	1,09E+04	1,61E+07	7,57E+07
8	2,27E+02	3,31E+02	2,33E+04	2,41E+07	7,65E+07
8,5	2,29E+02	3,77E+02	5,00E+04	3,26E+07	7,70E+07
9	2,30E+02	4,41E+02	1,05E+05	4,08E+07	7,73E+07
9,5	2,32E+02	5,32E+02	2,15E+05	4,83E+07	7,74E+07
10	2,35E+02	6,60E+02	4,21E+05	5,47E+07	7,75E+07
10,5	2,38E+02	8,43E+02	7,84E+05	6,00E+07	7,76E+07
11	2,42E+02	1,11E+03	1,38E+06	6,43E+07	7,76E+07
11,5	2,47E+02	1,49E+03	2,31E+06	6,76E+07	7,76E+07
12	2,53E+02	2,07E+03	3,66E+06	7,01E+07	7,76E+07
12,5	2,60E+02	2,92E+03	5,50E+06	7,20E+07	7,76E+07
13	2,68E+02	4,21E+03	7,89E+06	7,35E+07	7,76E+07
13,5	2,79E+02	6,15E+03	1,08E+07	7,46E+07	7,76E+07
14	2,91E+02	9,09E+03	1,43E+07	7,54E+07	7,76E+07
14,5	3,06E+02	1,35E+04	1,81E+07	7,60E+07	7,76E+07
15	3,23E+02	2,03E+04	2,23E+07	7,64E+07	7,76E+07
15,5	3,44E+02	3,04E+04	2,67E+07	7,67E+07	7,76E+07
16	3,69E+02	4,56E+04	3,12E+07	7,70E+07	7,76E+07
16,5	3,99E+02	6,79E+04	3,56E+07	7,71E+07	7,76E+07
17	4,35E+02	1,01E+05	3,99E+07	7,73E+07	7,76E+07
17,5	4,77E+02	1,48E+05	4,40E+07	7,74E+07	7,76E+07
18	5,29E+02	2,15E+05	4,79E+07	7,74E+07	7,76E+07

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
18,5	5,90E+02	3,08E+05	5,14E+07	7,75E+07	7,76E+07
19	6,64E+02	4,36E+05	5,47E+07	7,75E+07	7,76E+07
19,5	7,55E+02	6,09E+05	5,76E+07	7,75E+07	7,76E+07
20	8,63E+02	8,38E+05	6,02E+07	7,76E+07	7,76E+07
20,5	9,95E+02	1,14E+06	6,25E+07	7,76E+07	7,76E+07
21	1,16E+03	1,52E+06	6,46E+07	7,76E+07	7,76E+07
21,5	1,35E+03	1,99E+06	6,64E+07	7,76E+07	
22	1,59E+03	2,58E+06	6,80E+07	7,76E+07	
22,5	1,89E+03	3,29E+06	6,93E+07	7,76E+07	
23	2,26E+03	4,14E+06	7,05E+07	7,76E+07	
23,5	2,71E+03	5,13E+06	7,15E+07	7,76E+07	
24	3,27E+03	6,27E+06	7,24E+07	7,76E+07	
24,5	3,97E+03	7,57E+06	7,32E+07	7,76E+07	
25	4,83E+03	9,02E+06	7,38E+07	7,76E+07	
25,5	5,91E+03	1,06E+07	7,44E+07		
26	7,25E+03	1,24E+07	7,49E+07		
26,5	8,93E+03	1,42E+07	7,53E+07		
27	1,10E+04	1,62E+07	7,56E+07		
27,5	1,36E+04	1,83E+07	7,59E+07		
28	1,68E+04	2,05E+07	7,62E+07		
28,5	2,08E+04	2,28E+07	7,64E+07		
29	2,58E+04	2,51E+07	7,66E+07		
29,5	3,20E+04	2,75E+07	7,67E+07		
30	3,96E+04	2,98E+07	7,69E+07		
30,5	4,89E+04	3,22E+07	7,70E+07		
31	6,04E+04	3,46E+07	7,71E+07		
31,5	7,45E+04	3,69E+07	7,72E+07		
32	9,16E+04	3,92E+07	7,72E+07		
32,5	1,12E+05	4,14E+07	7,73E+07		
33	1,38E+05	4,35E+07	7,73E+07		
33,5	1,67E+05	4,56E+07	7,74E+07		
34	2,04E+05	4,76E+07	7,74E+07		
34,5	2,47E+05	4,96E+07	7,74E+07		
35	2,99E+05	5,14E+07	7,75E+07		
35,5	3,60E+05	5,32E+07	7,75E+07		
36	4,32E+05	5,48E+07	7,75E+07		
36,5	5,16E+05	5,64E+07	7,75E+07		
37	6,14E+05	5,79E+07	7,75E+07		
37,5	7,28E+05	5,93E+07	7,76E+07		
38	8,60E+05	6,06E+07	7,76E+07		
38,5	1,01E+06	6,19E+07	7,76E+07		
39	1,18E+06	6,30E+07	7,76E+07		
39,5	1,38E+06	6,41E+07	7,76E+07		

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
40	1,60E+06	6,51E+07	7,76E+07		
40,5	1,85E+06	6,61E+07	7,76E+07		
41	2,13E+06	6,70E+07	7,76E+07		
41,5	2,44E+06	6,78E+07	7,76E+07		
42	2,78E+06	6,85E+07	7,76E+07		
42,5	3,16E+06	6,93E+07			
43	3,58E+06	6,99E+07			
43,5	4,04E+06	7,05E+07			
44	4,53E+06	7,11E+07			
44,5	5,07E+06	7,16E+07			
45	5,65E+06	7,21E+07			
45,5	6,27E+06	7,25E+07			
46	6,94E+06	7,29E+07			
46,5	7,66E+06	7,33E+07			
47	8,41E+06	7,37E+07			
47,5	9,20E+06	7,40E+07			
48	1,00E+07	7,43E+07			
48,5	1,09E+07	7,45E+07			
49	1,18E+07	7,48E+07			
49,5	1,28E+07	7,50E+07			
50	1,38E+07	7,52E+07			
50,5	1,48E+07	7,54E+07			
51	1,59E+07	7,56E+07			
51,5	1,70E+07	7,58E+07			
52	1,81E+07	7,59E+07			
52,5	1,92E+07	7,61E+07			
53	2,04E+07	7,62E+07			
53,5	2,16E+07	7,63E+07			
54	2,28E+07	7,64E+07			
54,5	2,40E+07	7,65E+07			
55	2,52E+07	7,66E+07			
55,5	2,64E+07	7,67E+07			
56	2,77E+07	7,68E+07			
56,5	2,89E+07	7,68E+07			
57	3,02E+07	7,69E+07			
57,5	3,14E+07	7,70E+07			
58	3,27E+07	7,70E+07			
58,5	3,39E+07	7,71E+07			
59	3,51E+07	7,71E+07			
59,5	3,64E+07	7,72E+07			
60	3,76E+07	7,72E+07			
60,5	3,88E+07	7,72E+07			
61	4,00E+07	7,73E+07			

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
61,5	4,11E+07	7,73E+07			
62	4,23E+07	7,73E+07			
62,5	4,34E+07	7,73E+07			
63	4,45E+07				
63,5	4,56E+07				
64	4,67E+07				
64,5	4,77E+07				
65	4,88E+07				
65,5	4,98E+07				
66	5,08E+07				
66,5	5,17E+07				
67	5,26E+07				
67,5	5,35E+07				
68	5,44E+07				
68,5	5,53E+07				
69	5,61E+07				
69,5	5,69E+07				
70	5,77E+07				
70,5	5,85E+07				
71	5,92E+07				
71,5	5,99E+07				
72	6,06E+07				
72,5	6,13E+07				
73	6,19E+07				
73,5	6,25E+07				
74	6,31E+07				
74,5	6,37E+07				
75	6,43E+07				
75,5	6,48E+07				
76	6,53E+07				
76,5	6,58E+07				
77	6,63E+07				
77,5	6,68E+07				
78	6,72E+07				
78,5	6,77E+07				
79	6,81E+07				
79,5	6,85E+07				
80	6,88E+07				
80,5	6,92E+07				
81	6,96E+07				
81,5	6,99E+07				
82	7,02E+07				
82,5	7,05E+07				

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
83	7,08E+07				
83,5	7,11E+07				

Tabela B: Densidades de bactérias lácticas (UFC/g), em salsichas armazenadas em diferentes temperaturas, calculadas a partir do modelo ajustado (equação 24).

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
0	1,10E+02	1,10E+02	1,10E+02	1,10E+02	1,10E+02
0,5	1,10E+02	1,10E+02	1,10E+02	1,10E+02	1,11E+02
1	1,10E+02	1,10E+02	1,10E+02	1,12E+02	1,49E+02
1,5	1,10E+02	1,10E+02	1,10E+02	1,22E+02	5,78E+02
2	1,10E+02	1,10E+02	1,12E+02	1,61E+02	7,70E+03
2,5	1,10E+02	1,10E+02	1,17E+02	2,99E+02	1,41E+05
3	1,10E+02	1,11E+02	1,26E+02	8,23E+02	1,55E+06
3,5	1,10E+02	1,11E+02	1,45E+02	3,17E+03	8,17E+06
4	1,10E+02	1,13E+02	1,80E+02	1,47E+04	2,32E+07
4,5	1,10E+02	1,15E+02	2,49E+02	6,90E+04	4,32E+07
5	1,10E+02	1,18E+02	3,83E+02	2,91E+05	6,17E+07
5,5	1,10E+02	1,23E+02	6,60E+02	1,02E+06	7,56E+07
6	1,11E+02	1,30E+02	1,25E+03	2,90E+06	8,47E+07
6,5	1,11E+02	1,40E+02	2,59E+03	6,71E+06	9,02E+07
7	1,12E+02	1,54E+02	5,65E+03	1,30E+07	9,35E+07
7,5	1,13E+02	1,75E+02	1,27E+04	2,16E+07	9,54E+07
8	1,14E+02	2,03E+02	2,90E+04	3,17E+07	9,64E+07
8,5	1,15E+02	2,43E+02	6,50E+04	4,25E+07	9,70E+07
9	1,16E+02	3,00E+02	1,41E+05	5,28E+07	9,73E+07
9,5	1,18E+02	3,83E+02	2,95E+05	6,21E+07	9,75E+07
10	1,21E+02	5,03E+02	5,84E+05	7,00E+07	9,76E+07
10,5	1,23E+02	6,82E+02	1,09E+06	7,64E+07	9,77E+07
11	1,27E+02	9,50E+02	1,93E+06	8,16E+07	9,77E+07
11,5	1,31E+02	1,36E+03	3,21E+06	8,56E+07	9,77E+07
12	1,36E+02	1,98E+03	5,05E+06	8,87E+07	9,77E+07
12,5	1,42E+02	2,95E+03	7,55E+06	9,10E+07	9,77E+07
13	1,50E+02	4,46E+03	1,07E+07	9,27E+07	
13,5	1,58E+02	6,81E+03	1,46E+07	9,40E+07	
14	1,69E+02	1,05E+04	1,91E+07	9,50E+07	
14,5	1,82E+02	1,62E+04	2,41E+07	9,57E+07	
15	1,97E+02	2,50E+04	2,95E+07	9,63E+07	
15,5	2,15E+02	3,85E+04	3,51E+07	9,66E+07	
16	2,37E+02	5,90E+04	4,07E+07	9,69E+07	
16,5	2,63E+02	8,97E+04	4,63E+07	9,71E+07	
17	2,95E+02	1,35E+05	5,17E+07	9,73E+07	
17,5	3,33E+02	2,01E+05	5,68E+07	9,74E+07	
18	3,80E+02	2,94E+05	6,15E+07	9,75E+07	
18,5	4,37E+02	4,26E+05	6,59E+07	9,76E+07	
19	5,08E+02	6,06E+05	6,99E+07	9,76E+07	

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
19,5	5,94E+02	8,49E+05	7,34E+07	9,76E+07	
20	7,01E+02	1,17E+06	7,66E+07	9,77E+07	
20,5	8,33E+02	1,59E+06	7,95E+07	9,77E+07	
21	9,97E+02	2,11E+06	8,20E+07	9,77E+07	
21,5	1,20E+03	2,78E+06	8,42E+07		
22	1,46E+03	3,58E+06	8,61E+07		
22,5	1,78E+03	4,56E+06	8,77E+07		
23	2,19E+03	5,71E+06	8,92E+07		
23,5	2,70E+03	7,05E+06	9,04E+07		
24	3,34E+03	8,58E+06	9,15E+07		
24,5	4,16E+03	1,03E+07	9,24E+07		
25	5,19E+03	1,22E+07	9,32E+07		
25,5	6,50E+03	1,44E+07	9,38E+07		
26	8,15E+03	1,66E+07	9,44E+07		
26,5	1,02E+04	1,91E+07	9,49E+07		
27	1,29E+04	2,17E+07	9,53E+07		
27,5	1,62E+04	2,44E+07	9,57E+07		
28	2,04E+04	2,72E+07	9,60E+07		
28,5	2,56E+04	3,01E+07	9,62E+07		
29	3,22E+04	3,31E+07	9,65E+07		
29,5	4,04E+04	3,61E+07	9,67E+07		
30	5,07E+04	3,91E+07			
30,5	6,34E+04	4,20E+07			
31	7,90E+04	4,50E+07			
31,5	9,84E+04	4,79E+07			
32	1,22E+05	5,07E+07			
32,5	1,51E+05	5,35E+07			
33	1,86E+05	5,62E+07			
33,5	2,28E+05	5,87E+07			
34	2,79E+05	6,12E+07			
34,5	3,40E+05	6,36E+07			
35	4,13E+05	6,59E+07			
35,5	4,99E+05	6,80E+07			
36	6,00E+05	7,01E+07			
36,5	7,19E+05	7,20E+07			
37	8,57E+05	7,38E+07			
37,5	1,02E+06	7,56E+07			
38	1,20E+06				
38,5	1,41E+06				
39	1,65E+06				
39,5	1,93E+06				
40	2,23E+06				
40,5	2,58E+06				

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
41	2,96E+06				
41,5	3,39E+06				
42	3,86E+06				
42,5	4,38E+06				
43	4,95E+06				
43,5	5,57E+06				
44	6,25E+06				
44,5	6,97E+06				
45	7,75E+06				
45,5	8,59E+06				
46	9,48E+06				
46,5	1,04E+07				
47	1,14E+07				
47,5	1,25E+07				
48	1,36E+07				
48,5	1,47E+07				
49	1,59E+07				
49,5	1,72E+07				
50	1,85E+07				
50,5	1,98E+07				
51	2,12E+07				
51,5	2,26E+07				
52	2,40E+07				
52,5	2,55E+07				
53	2,70E+07				
53,5	2,85E+07				
54	3,00E+07				
54,5	3,16E+07				
55	3,32E+07				
55,5	3,47E+07				
56	3,63E+07				
56,5	3,79E+07				
57	3,95E+07				
57,5	4,10E+07				
58	4,26E+07				
58,5	4,42E+07				
59	4,57E+07				
59,5	4,72E+07				
60	4,88E+07				
60,5	5,03E+07				
61	5,17E+07				
61,5	5,32E+07				
62	5,46E+07				

Tempo de estocagem (dias)	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C
62,5	5,60E+07				
63	5,74E+07				
63,5	5,88E+07				
64	6,01E+07				
64,5	6,14E+07				
65	6,26E+07				
65,5	6,39E+07				
66	6,51E+07				
66,5	6,62E+07				
67	6,74E+07				
67,5	6,85E+07				
68	6,96E+07				
68,5	7,06E+07				
69	7,16E+07				
69,5	7,26E+07				
70	7,36E+07				
70,5	7,45E+07				
71	7,54E+07				
71,5	7,63E+07				
72	7,71E+07				
72,5	7,79E+07				
73	7,87E+07				
73,5	7,95E+07				
74	8,02E+07				
74,5	8,09E+07				
75	8,16E+07				
75,5	8,22E+07				
76	8,29E+07				
76,5	8,35E+07				
77	8,41E+07				
77,5	8,46E+07				
78	8,52E+07				
78,5	8,57E+07				
79	8,62E+07				
79,5	8,67E+07				
80	8,71E+07				
80,5	8,76E+07				
81	8,80E+07				
81,5	8,84E+07				
82	8,88E+07				
82,5	8,92E+07				
83	8,96E+07				
83,5	8,99E+07				

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANWART, G.J. **Basic food microbiology**. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989, p.412, 545-546.
- BARANYI, J., ROBERTS, T.A. Dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **Int. J. Food Microbiol.**, v.23, p.277-294, 1994.
- BRATCHELL, N., GIBSON, A.M., TRUMAN, M., KELLY, T.M., ROBERTS, T.A. Predicting microbial growth: the consequences of quantity of data. **Int. J. Food Microbiol.**, v.8, p.47-58, 1989.
- BROCK, D.T., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Biology of microorganisms**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1994. p.3, 99, 322, 341-344, 794-797.
- 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*. **J. Food Protect.**, v.53, p.370-376, 381, 1990.
- BUCHANAN, R.L. Developing and distributing userfriendly application software. **J. Ind. Microbiol.**, v.12, p.251-255, 1993 (a).
- BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology. **Trends Food Sci. Technol.**, v.4, p.6-11, 1993 (b).
- COLE, M.B. Opinion: predictive modelling – yes it is! **Lett. Appl. Microbiol.**, v.13, p. 218-219, 1991.
- DALGAARD, P., ROSS, T., KAMPERMAN, L., NEUMEYER, K., McMEEKIN, T.A. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. **Int. J. Food Microbiol.**, v.23, p.391-404, 1994.
- DAVIES, E.A., MILNE, C.F., BEVIS, H.E., POTTER, R.W., HARRIS, J.M., WILLIAMS, G.C., THOMAS, L.V., BROUGHTON, J.D. Effective use of

Nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed Bologna-type sausage. *J. Food Protect.*, v.62, p.1004-1010, 1999.

DRAPER, N.R., SMITH, H. **Applied regression analysis**, 2.ed. New York: John Wiley and Sons, 1981. Apud: McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. **Predictive microbiology: theory and application**. Taunton: Research Studies, 1993. p.1-86.

FARBER, J.M. Predictive modeling of food deterioration and safety. In: PIERSON, M.D., STERN, N.J. **Foodborne microorganisms and their toxins**. New York: Marcel Dekker, 1986. p.57-90.

GIBSON, A.M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T.A. Predicting microbial growth : growth responses of *salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride, and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, v.6, p.155-178, 1988.

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. *J. Appl. Bacteriol.*, v.62, p.479-490, 1987.

GILL, C.O. Temperature function integration for hygiene evaluation of food processing procedures. *Food Tech. Aust.*, v.38, p.203-204, 1986.

GILL, C.O., JONES, S.D.M., TONG, A.K.W. Application of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a process for spray chilling beef carcasses. *J. Food Protect.*, v.54, p.731-736, 1991 (a).

GILL, C.O., HARRISON, J.C.L., PHILLIPS, D.M. Use of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. *Food Microbiol.*, v.8, p.83-94, 1991 (b).

GOLDBLITH, S.A., JOSLYN, M.A., NICKERSON, J.T.R. **An introduction to thermal processing of foods**. Vol. 1, Westport: AVI, 1961. 1128 p.

- Apud: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology - fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997, p. 728-739.
- HASTIE, T.J., TIBSHIRANI, R.J. **Generalized additive models**. New York: Chapman & Hall, 1990. Apud: ANDRÉ, C.D.S., RANCAN, A.C. **Relatório de análise estatística sobre o projeto: Aplicação da microbiologia preditiva na avaliação de salsichas**. São Paulo, IME-USP, 1999, 62p.
- HOLY, A. von, CLOETE, T.E., HOLZAPFEL, W.H. Quantification and characterization of microbial populations associated with spoiled, vacuum-packed Vienna sausage. **Food Microbiol.**, v.8, p.95-104, 1991.
- HUDSON, J.A. Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.16, p.274-276, 1993.
- HUET, S., BOUVIER, A., GRUET, M.A., JOLIVET, E. **Statistical tools for nonlinear regression**. Springer-Verlag Inc., 1996, p.131-41.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods: microbial ecology of food commodities**. London: Blackie Academic, 1998. p.49-52.
- JAY, J.M. **Modern food microbiology**. New York: AVI, 1992, p.314-315.
- JUDGE, M., ABERLE, E., FORREST, J., HEDRICK, H., MERKEL, R. **Principles of meat science**. Dubuque: Kendall / Hunt, 1989. p.175-187.
- KRAMLICH, W.E. Sausage products. In: PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B.S. **Science of meat and meat products**. San Francisco: W.H. Freeman, 1971. p.484-492.
- LABUZA, T.P. **Shelf life dating of foods**. Westport: Food & Nutrition, 1982, p.1.

- LUKE, K. Characterization of microbial spoilage of vacuum-packaged Bruehwurst sausages. Berlim, 1978. 103p. (Tese de doutorado - Universidade de Berlim). Apud: Food Sci. Technol. Abstr. [CD-ROM] Norwood: Silver Plate International, c1999. AN: 79-07-S1157.
- MAKELA, P.M., KORKEALA, H.J. *Lactobacillus* contamination of cooked ring sausages at sausage processing plants. **Int. J. Food Microbiol.**, v.5, p.323-330, 1987.
- MAKELA, P.M., KORKEALA, H.J., LAINE, J.J. Raw materials of cooked ring sausages as a source of spoilage lactic acid bacteria. **J. Food Protect.**, v.53(11), p.965-968, 1990.
- MARINKOVIC, D., NIKOLIC, R., BOZOVIC, V., POZANIC, S., MARJANOVIC, M. Keeping characteristics of frankfurter-type sausage in Belgrade wholesale and retail storage facilities. **Tehnologija-Mesa**, v.24(5), p.143-146, 1983. Apud: Food Sci. Technol. Abstr. [CD-ROM] Norwood Silver Plate International, c1999. AN: 84-04-S0672.
- McCLURE, P.J., COLE, M.B., DAVIES, K.W., ANDERSON, W.A. The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models. **J. Ind. Microbiol.**, v.12, p.277-285, 1993.
- McMEEKIN, T.A., BROWN, J., KRIST, K., MILES, D., NEUMEYER, K., NICHOLS, D.S., OLLEY, J., PRESSER, K., RATKOWSKY, D.A., ROSS, T., SALTER, M., SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: a basis for food safety. **Emerging Infect. Dis.**, v.3(4), p.541-549, 1997.
- McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. **Predictive microbiology: theory and application**. Taunton: Research Studies, 1993. p.1-86.
- NETER, J., WASSERMAN, W., KUTNER, M.H. **Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, experimental designs**. 3.ed. Homewood: Richard D. Irwing, 1996. 1127p. Apud: ANDRÉ, C.D.S.,

- RANCAN, A.C. **Relatório de análise estatística sobre o projeto: Aplicação da microbiologia preditiva na avaliação de salsichas.** São Paulo, IME-USP, 1999, 62p.
- NETER, J., KUTNER, M.H., NACHTSHEIM, C.J., WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models.** 4.ed. Times Mirror Higher Education Group, Inc., 1996 b, p.400-54.
- OWENS, J.D., THOMAS, D.S., THOMPSON, P.S., TIMMERMAN, J.W. Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations, **Letts. Appl. Microbiol.**, v.9, p.245-249, 1989.
- PARDI, M.C., SANTOS, I.F., SOUZA, E.R., PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne.** Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1994. p.794-802, 815-824, 844-851.
- PEARSON, A.M., TAUBER, F.W. **Processed meats.** Westport: AVI, 1984. p.187-189.
- RATKOWSKY, D.A. **Nonlinear regression modeling: a unified practical approach.** New York: Marcel Dekker, 1983 (a). Apud: RATKOWSKY, D.A. Principles of nonlinear regression modelling. **J. Ind. Microbiol.**, v.12, p.195-199, 1993.
- RATKOWSKY, D.A. Principles of nonlinear regression modelling. **J. Ind. Microbiol.**, v.12, p.195-199, 1993 (b).
- ROBERTS, T.A., JARVIS, B. Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. In: ROBERTS, T.A., SKINNER, F.A. **Food microbiology: advances and prospects.** New York: Academic Press, 1983, p.85-95.
- ROSS, T., McMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. **Int. J. Food Microbiol.**, v.23, p.241-264, 1994.

- ROSS, T., McMEEKIN, T.A. Predictive microbiology: Applications of a square root model. **Food Aust.**, v.43, p.202-207, 1991.
- SCHNEIDER, I.S. **Contribuição ao estudo da coloração verde em produtos de salsicharia.** São Paulo 1956, (Tese de Livre-Docência - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo). Apud: PARDI, M.C. , SANTOS, I.F., SOUZA, E.R., PARDI, H.S. **Clência, higiene e tecnologia da carne.** Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1994. p.844-851.
- SCOTT, W.J. The growth of micro-organisms on ox muscle. II . The influence of temperature. **J. Council Scientific Ind. Res. Aust.**, v.10, p.338-350, 1937.
- SINELL, H.J., LUKE, K. D-lactate as a parameter of the microbial load of vacuum-packaged Bruehwurst sausages. In: EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH WORKERS, 24, Berlin, 1978. **Proceedings.** Apud: Food Sci. Technol. Abstr. [CD-ROM] Norwood Silver Plate International, c1999. AN:80-08-S1494.
- SKINNER, G.E., LARKIN, J.W., RHODEHAMEL, E.J. Mathematical modelling of microbial growth: a review. **J. Food Safety**, v.14, p.175-217, 1994.
- STEWART, G.F., AMERINE, M.A. **Introduction to food science and technology.** New York: Academic Press, 1973. p.139 -141.
- VARNAM, A.H., SUTHERLAND, J.P. **Meat and meat products.** London: Chapman & Hall, 1995. p. 288-290.
- WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiol.**, v.10, p.175-177, 1993.
- 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.

WHITING, R.C. Microbial database buiding: what have we learned ? **Food Technol.**, v.51(4), p.82-86, 1997.

WIJZES, T., McCLURE, P.J., ZWIETERING, M.H., ROBERTS, T.A. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. **Int. J. Food Microbiol.**, v.18, p.139-149, 1993.

WURLITZER, N.J., AMBIEL, C. APPCC/HACCP em fabricação de salsichas. **Revista Nacional da Carne**, v.271, p.50-60, 1999.

LIV.	<i>Recado do Autor</i>
N. E.	-
DATA	<i>14/03/04</i>
PREÇO	-
TOMBAMENTO	<i>14106/04</i>

*:17849

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo