



## Área: Engenharia de Alimentos

# AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO *IN VITRO* E VALIDAÇÃO DE SOFTWARE PREDITIVO

**Angélica Jacobi Danielli\*, Rogério Luis Cansian, Geciane Toniazco Backes, Rosicler Colet**

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS*

*\*E-mail: angelicajanielli@hotmail.com*

**RESUMO** – A microbiologia preditiva consiste em estimar o potencial de crescimento de microrganismos específicos em diferentes condições, esta juntamente com a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) tem grande potencial como ferramenta de tomada de decisão em uma indústria alimentícia, de modo a garantir a qualidade e a segurança dos alimentos. A temperatura é considerada um dos fatores que influenciam favoravelmente no desenvolvimento bacteriano. Mediante as alterações previstas na Portaria nº 210/98 pela Portaria nº 74/19 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a variação aceitável de temperatura dos produtos no ambiente de corte e manipulação poderia ser estabelecida e validada como base em microbiologia preditiva. Em razão disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de crescimento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp., *in vitro*, nas temperaturas de 7, 12, 15 e 20°C, em pH 7 e  $a_w$  de 0,99. Os resultados experimentais foram aplicados e comparados com o *software* ComBase Predictor® (modelo terciário) de modo a validar os dados obtidos na temperatura de 12°C em relação às condições industriais. Como esperado, observou-se uma redução na fase log com o aumento da temperatura de incubação, resultado também predito pelo *software*. *Salmonella* sp. apresentou os menores tempos de fase lag em todas as temperaturas avaliadas ou preditas pelo *software*. A partir das análises realizadas foi possível que nas diferentes condições avaliadas *in vitro*, a fase lag dos microrganismos foi maior que as preditas pelo *software*.

**Palavras-chave:** Bactérias, Microbiologia preditiva, ComBase Predictor.

## 1 INTRODUÇÃO

Obter alimentos seguros é a finalidade de toda indústria alimentícia, e para garantir a segurança microbiológica tem-se estimulado a aplicação da microbiologia preditiva (MEZARROBA, 2014; COSTA, 2016). A microbiologia preditiva consiste em estimar o potencial de crescimento de microrganismos específicos em diferentes condições, existem algumas classificações que podem ser classificadas em três níveis, descritos como primário, secundário e terciário, e aplicados no intuito de melhorar a qualidade e segurança alimentar (NAKASHIMA et al., 2000; FAKRUDDIN et al., 2011; MATOS, 2014).

A carne de frango é muito vulnerável a deterioração microbiológica, pois é rica em nutrientes, possui alta atividade de água e seu pH é próximo a neutralidade (PACHECO, 2013). Os microrganismos podem proliferar, dividindo-se e aumentando em número; sofrer inativação ou morte, diminuindo em número, ou ainda, manter-se num estado em que sobrevivem, porém sem proliferação, permanecendo em número constante (OLIVEIRA, 2009; MATOS, 2014).

Estudar o comportamento de um microrganismo nas diversas condições ambientais permite ampliar o conhecimento em relação as suas características, implicando diretamente em todas as etapas da cadeia de produção de um alimento (OLIVEIRA et al., 2013; COSTA, 2016). A temperatura, por exemplo, é um fator de extrema importância, caso o produto fique exposto a condições não adequadas de temperatura, maiores serão as chances de deterioração por microrganismos (ANJOS, 2013).

Em um abatedouro de aves há várias etapas do processo relacionadas à temperatura. Antes da etapa de processamento de cortes, onde ocorre a separação de cada corte específico, está o sistema de pré-resfriamento de carcaças, o qual consiste em um sistema por imersão, com a finalidade de realizar o resfriamento das carcaças de modo a atender a legislação vigente com saída deste sistema com temperatura igual ou inferior a 7°C, e que a variação aceitável de temperatura dos produtos no ambiente de corte e manipulação deve ser estabelecida e validada como base em microbiologia preditiva, de forma garantir a manutenção do binômio tempo e temperatura que garanta a ausência de multiplicação de patógenos e a produção de toxinas, respeitando o resfriamento dos cortes a 4°C em até 4 horas (BRASIL, 1998; BRASIL, 2019).

Os *softwares* são modelos terciários, oriundos da transformação de modelos primários e secundários, que podem calcular respostas microbianas variando condições ambientais, comparando efeitos de diferentes condições e determinando o comportamento de diversos microrganismos (ANJOS, 2013; PAULSEN; SMULDERS, 2014).

Ao realizar simulações em uma situação ou condição pré-estabelecida a partir do modelo terciário, é possível avaliar a probabilidade de uma taxa de crescimento em uma condição pré-determinada de pH e temperatura, associada a probabilidade do valor desta mesma taxa quando em diferentes condições dessas variáveis. Isto é fundamental para a



gestão de risco em indústrias de alimentos, pois é possível verificar, caso ocorra algum desvio no processo, a probabilidade de seu produto atingir determinada população microbiana (SCOLFORO, 2018).

As ferramentas preditivas possuem limites que condicionam a sua utilização, em alguns programas não é possível efetuar previsões, pois não há possibilidade de extrapolar fora dos intervalos nos quais foram baseados. Considerando a importância da realização da avaliação de pH, temperatura e  $a_w$ , na literatura o *software* ComBase Predictor® foi o que melhor se adapta aos parâmetros utilizados para obtenção dos valores preditivos. O *software* ComBase Predictor® é uma ferramenta com um amplo banco de dados, chegando a mais de 50.000 registros, os quais incluem valores para parâmetros de inativação e crescimento de microrganismos em diferentes meios de cultura ou em diversos alimentos. Neste *software* é possível simular o crescimento e inativação para mais de 15 microrganismos nos intervalos de previsão da base de dados (GARRE et al., 2017).

Com base nisso, avaliou-se a cinética de crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. *in vitro*, com pH 7,0, atividade de água 0,99 e temperatura de crescimento (7°C, 12°C, 15°C e 20°C) e comparou-se os dados obtidos com o *software* ComBase Predictor® de modo a validar a temperatura de 12°C.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação do comportamento de crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp., as cepas foram previamente inoculadas em caldo Luria Bertani – LB (10g/L triptona, 5g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl) e incubadas por 24 horas a 37°C, foi realizada a diluição a partir da inoculação  $10^8$  até  $10^3$ , então foram construídas curvas cinéticas com leituras a cada hora a partir da inoculação  $10^3$  em caldo LB em microplacas de fundo chato (5  $\mu$ L em 250  $\mu$ L de meio) e realizado leitura da absorbância em 490 nm em leitor de microplacas Elisa. O caldo LB foi mantido em pH 7,0 e atividade de água 0,99, simulando um produto cárneo. Estes meios foram armazenados em 4 diferentes temperaturas, 7, 12, 15 e 20°C. O crescimento microbiano foi estimado pelo aumento da absorbância medido a cada hora em relação à absorbância inicial.

Os valores de temperatura foram escolhidos a partir de faixas utilizadas na indústria alimentícia, sendo 7°C o valor estabelecido pela legislação na saída do sistema de pré resfriamento, 12°C o valor a ser validado, e 15 e 20°C por extrapolação da margem de segurança.

Para conversão dos valores de absorbância em Log UFC, foi construída uma curva padrão relacionando-se diferentes contagens de cada bactéria em Log, com a respectiva absorbância, e a conversão obtida pela equação da reta desta curva padrão e diferentes diluições das culturas microbianas.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os tempos de crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp., para a avaliação *in vitro* e empregando o *software* ComBase Predictor® nas mesmas condições.

**Tabela 1.** Tempos de fase lag dos microrganismos na avaliação *in vitro* e no *software* em diferentes temperaturas, nas mesmas condições de pH e  $a_w$ .

Microrganismo	Temperatura	Tempo fase lag avaliação <i>in vitro</i> (h)	Tempo fase lag predito pelo Software (h)
<i>Escherichia coli</i>	12°C	58	34
	15°C	29	18
	20°C	14	7
<i>Listeria monocytogenes</i>	12°C	72	27
	15°C	40	17
	20°C	21	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	12°C	60	53
	15°C	29	26
	20°C	14	9
<i>Salmonella</i> sp.	12°C	52	31
	15°C	24	14
	20°C	12	6

Ao comparar-se os dados resultantes da análise do *software* e o resultado obtido *in vitro* (Tabela 1) observa-se que o aumento da temperatura provoca uma redução no tempo de fase lag para todos os microrganismos avaliados *in vitro*



com mesmo comportamento predito pelo *software* ComBase Predictor®. Na temperatura de 7°C observou-se uma ampla fase lag, com menor tempo de crescimento de 300h (dados não mostrados) os quais não foram comparados pois o software não possui esta condição para *E. coli*. Para os demais microrganismos, a avaliação realizada no programa, indica presença de crescimento bacteriano em pH neutro (fase log em 56 h ou superior).

Os menores tempos de fase lag de crescimento *in vitro* foram observados com *Salmonella* sp., resultado também predito pelo software. Já, *S. aureus* apresentou os maiores tempos de fase lag em comparação com os outros microrganismos avaliados, independentemente da temperatura de incubação *in vitro* ou simulação no software.

Em todas as condições de temperatura, o tempo de duração da fase lag predito pelo *software* é menor em relação aos tempos de fase lag obtidos com o crescimento dos microrganismos *in vitro*, indicando que o software foi programado com cinéticas de crescimento elevadas, superiores às observadas experimentalmente.

Matos (2014) aplicou microbiologia preditiva através de dois *softwares*, ComBase Predictor e Pathogen Modeling Program, para análise de amostras de carne bovina e suína armazenadas a 5°C e 10°C, comparando os resultados obtidos através da análise microbiológica clássica para *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. O estudo indicou que a ferramenta preditiva ComBase conseguiu efetuar melhores previsões para o crescimento destes microrganismos, adequando-se de igual forma para ambas as amostras, aproximando estes resultados aos obtidos em laboratório.

## 4 CONCLUSÃO

Com a avaliação da cinética de crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. *in vitro*, foi possível determinar que os tempos de crescimento obtidos foram satisfatórios, sendo possível garantir que até em 20°C o tempo de duração da fase lag ocorreu em no mínimo 12 h.

O tempo e a temperatura propostos através do estudo garantem a segurança e a qualidade dos produtos no ambiente de corte, visto que a fase log, ou de crescimento exponencial, caracterizada pelo momento de maior atividade metabólica não foi atingida mesmo após a elevação da temperatura para todos os microrganismos de interesse, com o menor tempo de duração de fase lag obtido em 12°C de 52 h, atendendo o que prevê a portaria nº 74/19 do MAPA.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, a CAPES, a FAPERGS e a URI pelo suporte financeiro.

## 6 REFERÊNCIAS

- ANJOS, L. D. **Modelos de crescimento de psicrotróficos em diferentes temperaturas e pH**. Dissertação para obtenção do título de Mestre, Lavras, 2013.
- BRASIL, Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 10 de Novembro de 1998. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositório/Portaria-210\\_000h19kjan02wx7ha0e2uuw60rmjy11.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositório/Portaria-210_000h19kjan02wx7ha0e2uuw60rmjy11.pdf), acesso em 26 de Maio de 2019.
- BRASIL, Portaria nº 74 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de 07 de Maio de 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n%C2%BA-74-de-7-de-maio-de-2019-87305783>, acesso em 26 de Maio de 2019.
- COSTA, D. S. **Modelagem probabilística do crescimento de *Listeria monocytogenes* em função do efeito de pH, Temperatura e tempo de estocagem**. Dissertação para obtenção do Título de Magister Scientiae, Viçosa, 2016.
- FAKRUDDIN, M. D. MAZUMDER, R. M., MANNAN, K. S. B. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science* n.40, v.2, p. 121-131, 2011.
- GARRE, A., FERNANDEZ, P. S., LINDQVIST, R., EGEE, J. A. Bio inactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Research International* n. 93, p. 66–74, 2017.
- MATOS, L. R. **Microbiologia Preditiva aplicada à análise de amostras de carne de vaca e porco**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Lisboa, 2014.
- MEZAROBA, M. E. P. C. **Avaliação da vida útil de filés de frango resfriados, embalados a vácuo e em atmosfera modificada, sob armazenamento isotérmico e não isotérmico**. Tese para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2014.
- NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, D.S.; FRANCO, B.D.G.M. **Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva**. Brazilian Journal of Food Technology. v.3,p.41-51, 2000.
- OLIVEIRA, F. M. **Evolução da carga microbiológica de uma refeição pré-cozinhada- Resultados experimentais e Microbiologia Preditiva**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, Portugal, 2009.



- OLIVEIRA, A.P., REZENDE, C. S. M., SOLA, M. C., FEISTEL, J. C., OLIVEIRA, J. J. **Microbiologia Preditiva**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p.1909-1928, 2013.
- PACHECO, D. O. **Qualidade microbiológica da cadeia de carne de aves da região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Pelotas, 2013.
- PAULSEN, P., SMULDERS, F. J. M. **Microbiology**. Encyclopedia of Meat Sciences, University of Veterinary Medicine Vienna, volume 2, p. 861–868, Austria, 2014.
- SCOLFORO, C. Z. **Modelagem preditiva do crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* em co-cultura com *Enterococcus faecalis***. 2018. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2018.