
Modelagem matemática da inativação da microbiota natural do leite cru em diferentes condições não-isotérmicas

Vanessa Carolina Martins Prina, Daniel Angelo Longhi

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-16-9.c3>

Resumo

O tratamento térmico do leite cru é uma operação que tem por objetivo a redução da sua microbiota natural, promovendo a diminuição do risco de veiculação de patógenos. A aplicação de um binômio de tempo-temperatura assertivo pode contribuir para a obtenção de benefícios tecnológicos aos derivados do leite tratado termicamente. O objetivo do presente trabalho foi quantificar e modelar a inativação da microbiota natural do leite cru em diferentes condições não-isotérmicas. Quatro amostras de leite cru foram submetidas a diferentes taxas médias de aquecimento (0,23 °C/min seguida de 0,73 °C/min, 0,80 °C/min, 1,31 °C/min, e 1,74 °C/min) até atingir 90 °C. A enumeração das bactérias viáveis no leite foi realizada com Ágar Padrão para Contagem (PCA) em função do tempo dos tratamentos. Um modelo cinético de primeira ordem e dois modelos secundários (adaptado de Rosso e colaboradores e empírico proposto neste estudo) foram ajustados aos dados experimentais de sobrevivência. Os modelos ajustados aos dados resultaram em índices estatísticos satisfatórios e semelhantes entre si. Os modelos foram validados com dados da literatura, com valores dos percentuais de tendência e discrepância dependentes das taxas de aquecimento dos perfis de temperatura analisados. Portanto, os modelos sugeridos podem ser úteis na análise de processos de inativação térmica da microbiota natural do leite cru.

Palavras-chave: microbiologia preditiva, qualidade de alimentos, segurança de alimentos, tratamento térmico.

1. Introdução

Leite é o produto da secreção mamária das fêmeas de mamíferos, obtida através da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite obtido dos demais animais devem ser designados conforme sua procedência (BRASIL, 2017). O gado de leite é o principal animal explorado no setor leiteiro, a qual corresponde a cerca de 81,6% da produção global; o restante das parcelas se divide entre os leites de búfala (14,5%), de cabra (2,3%), de ovelha (1,3%) e de camela (0,3%), estes por sua vez mais utilizados para o processamento de derivados lácteos (FAO, 2013; CRUZ et al., 2016; EMBRAPA, 2019).

Devido a seu elevado valor biológico, o leite é tido como o alimento *in natura* mais completo, fonte de proteínas, gorduras, carboidratos e demais componentes essenciais, sobretudo o cálcio, sendo uma das fontes mais adequadas deste nutriente (TRONCO, 2013). Suas características particulares, atreladas à versatilidade de aplicações tecnológicas, culminam na importância deste alimento na dieta humana, em especial nos primeiros estágios da vida (FAO, 2013; TRONCO, 2013; CRUZ et al., 2016).

A elevada quantidade e qualidade de nutrientes presentes, além da alta atividade de água e pH próximo ao neutro, fazem do leite cru um excelente meio de cultura para uma grande variedade de gêneros de micro-organismos. Além disso, más condições de higiene, desde a ordenha até o transporte à indústria, além de desrespeito aos binômios de temperatura e tempo de resfriamento e armazenamento definidos por legislação (resfriamento após a ordenha até 4 °C em até 3 horas, com armazenamento até 4 °C por até 48 horas – BRASIL, 2018), propiciam múltiplas fontes de contaminação ao leite, seja por microrganismos deteriorantes como patogênicos (TATINI et al., 1991).

Tanto o leite destinado ao consumo quanto o leite usado para a fabricação de produtos lácteos devem ser de boa qualidade e passar por pré-tratamentos pertinentes, como a filtração, a padronização e a homogeneização (FAO, 2013; BRASIL; 2017; CRUZ et al., 2017). A qualidade microbiológica do leite recepcionado é um aspecto fundamental a ser observado pelos laticínios, considerando que quanto menores as concentrações microbianas iniciais menores também são as perdas relacionadas a degradação da matéria-prima,

além de abrir a possibilidade de redução da intensidade do tratamento térmico utilizado, sujeitando o leite a tratamentos mais brandos.

O tratamento térmico é uma etapa que normalmente tem por objetivo a eliminação ou redução dos micro-organismos presentes no leite cru. Esse tratamento diminui o risco em potencial de veiculação de doenças transmitidas por alimentos e aumenta a vida útil do leite, já que é proibido pela legislação brasileira o uso de conservantes químicos no leite (TRONCO, 2013; BRASIL, 2017). A diminuição da microbiota presente é essencial para a fabricação de leites fermentados, como no caso do iogurte, já que diminui os riscos de micro-organismos presentes no meio competirem com as culturas iniciadoras, responsáveis pela fermentação. A aplicação do tratamento térmico diminui também a susceptibilidade à sinérese dos géis lácteos, o que é desejável na produção de iogurte, visto que é considerada como um defeito e afeta na percepção da aparência do produto pelos consumidores (SAVELLO, DARGAN, 1997; DAVANÇO et al., 2009). Não obstante, o tratamento térmico favorece o início do crescimento da cultura láctica devido a redução da concentração de oxigênio no leite e da desnaturação proteica, o que influencia no aumento da viscosidade do iogurte e na obtenção de uma textura adequada ao produto (DAVANÇO et al., 2009; TRONCO, 2013).

Os principais tratamentos térmicos aplicados ao leite cru e seus respectivos binômios de temperatura e tempo são a pasteurização lenta (processo *low temperature long time* – *LTLT*), que ocorre entre 63 °C e 65 °C por 30 min; a pasteurização rápida (processo *high temperature short time* – *HTST*), que ocorre entre 72 °C e 75 °C por 15 a 20 segundos; e o processo de ultra alta temperatura (*ultra high temperature* – *UHT*), que ocorre entre 130 °C e 150 °C por 2 a 4 segundos (BRASIL, 2017).

As temperaturas e tempos de pasteurização, rápida ou lenta, são suficientes para inativar os micro-organismos patogênicos, bem como reduzir o número de leveduras, fungos, bactérias gram-negativas e algumas gram-positivas. De acordo com o artigo nº 255 do RIISPOA, a pasteurização é designada como o tratamento térmico aplicado ao leite com objetivo de evitar perigos à saúde pública decorrentes de micro-organismos patogênicos

eventualmente presentes, e que promove mínimas modificações químicas, físicas, sensoriais e nutricionais (BRASIL, 2017).

Os tratamentos térmicos de inativação da microbiota presente no leite que são eficazes, entretanto, não consideram o histórico de temperatura do leite até o atingimento da temperatura do processo (taxas de aquecimento). Em tratamentos térmicos lentos (como o *LTLT*) pode ocorrer o crescimento de micro-organismos no início do fornecimento de calor, pois estes são submetidos primeiro a temperaturas favoráveis ao desenvolvimento e, só em seguida, com o aumento da temperatura, são inativados. O crescimento microbiano pode afetar a qualidade da matéria-prima devido, por exemplo, ao aumento da concentração de ácido láctico resultante da fermentação da lactose e pela excreção de enzimas lipolíticas e/ou proteolíticas normalmente indesejáveis na matéria-prima. Portanto, considerar o histórico de temperatura para quantificar o comportamento dos micro-organismos presentes no meio pode levar a um processo mais eficaz que os binômios utilizados atualmente pelos laticínios, isso em conformidade com a legislação, que permite novas combinações de tempo e temperatura de aquecimento, desde que seja comprovada a equivalência aos processos já estabelecidos (BRASIL, 2017).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta capaz de descrever e prever o comportamento microbiano, sendo uma grande aliada no estudo, simulação e otimização de processos, fornecendo precisão e exatidão na tomada de decisões sobre aspectos relacionados à qualidade do produto (McMEEKIN et al., 1997). Estudos como Van Impe et al. (1992) e Dalgaard (1995) já apontavam a microbiologia preditiva como recurso para a predição da vida útil dos alimentos. Chandler e McMeekin (1985) e Griffiths (1994) já recomendavam o uso de modelos preditivos em produtos lácteos, como ferramenta eficaz tanto para determinação do prazo de validade, quanto como indicador da eficácia do tratamento térmico do leite.

Particularmente no processamento de alimentos, a microbiologia preditiva unifica conhecimentos da engenharia, da microbiologia, da ciência de alimentos, da matemática e da estatística para prever o comportamento dos micro-organismos, seja o crescimento, a sobrevivência ou a inativação, através de modelos matemáticos que descrevem, quantitativamente, os efeitos de fatores

intrínsecos (como composição, atividade de água, pH e acidez) e extrínsecos (como temperatura e umidade relativa) sobre o comportamento da microbiota presente no alimento (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003).

Os modelos preditivos, segundo Whiting e Buchanan (1993), podem ser classificados em níveis de modelagem em modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem as respostas microbianas (crescimento ou inativação) em função do tempo para um único conjunto de condições. A quantificação do comportamento dos micro-organismos em líquidos normalmente é expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003).

Os modelos secundários descrevem a dependência dos parâmetros cinéticos em função dos fatores de análise (intrínsecos e/ou extrínsecos) (WHITING; BUCHANAN, 1993). Embora o principal fator que controle o comportamento microbiano em um tratamento térmico seja a temperatura, esses modelos podem ser expandidos para incluir demais condições, como, por exemplo, o pH e atividade de água, já que também influenciam na estabilidade microbiana (VAN IMPE et al., 1992; JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003). Exemplos clássicos destes modelos preditivos são os baseados nas equações de Arrhenius (DAVEY, 1991), da Raiz Quadrada (RATKOWSKY et al., 1982) e dos parâmetros cardinais (ROSSO et al., 1995).

Os modelos terciários, por sua vez, são incorporados a *softwares* e programas com interfaces simples, desenvolvidos com o intuito de fornecer previsões para pessoas não familiarizadas com as técnicas de modelagem (WHITING; BUCHANAN, 1993). Estes utilizam combinações de um ou mais modelos primários e secundários para quantificar as respostas dos micro-organismos frente a uma condição ambiental, comparam o efeito de diferentes condições sobre os micro-organismos ou ainda comparam o comportamento de diversos micro-organismos (WHITING; BUCHANAN, 1993).

Uma etapa crucial do desenvolvimento de novos modelos preditivos é a validação, de forma a comprovar o seu desempenho em prever o comportamento dos micro-organismos. A validação é um processo complexo; segundo Baranyi e Roberts (1995), é um grande dilema modelar as respostas do comportamento microbiano em alimentos e gerar modelos que possam fornecer

predições aplicáveis na prática. Isto ocorre devido a variabilidade e complexidade de estruturas presentes nos alimentos e ao fato das respostas serem variadas e facilmente mutáveis de acordo com as circunstâncias intrínsecas e extrínsecas ao meio (BARANYI; ROBERTS, 1995). Além disso, cada etapa da construção do modelo introduz erros, o que torna impossível que as predições do modelo correspondam perfeitamente às observações, o que torna o processo de validação tão complexo (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003). Em suma, no processo de validação deve-se comparar o comportamento predito pelo modelo para o micro-organismo em relação ao comportamento do mesmo micro-organismo observado em alimentos (McCLURE et al., 1994; JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003) e utilizar índices estatísticos para mensurar os desvios entre as predições e as observações experimentais.

Duh e Schaffner (1993) utilizaram índices estatísticos, como a raiz quadrada do erro-quadrático-médio (*RMSE*, do inglês *root mean-squared-error*) e o coeficiente de determinação (R^2) para avaliar a confiabilidade de seu modelo. Ross (1996) propôs os fatores de tendência (B_f , do inglês *bias fator*) e de exatidão (A_f , do inglês *accuracy factor*), como índices para a avaliação de desempenho, que fornecem respostas simples e quantitativas em relação a confiabilidade dos modelos. Baranyi et al. (1999), por sua vez, baseados nos fatores *bias* e *accuracy*, propuseram os percentuais de tendência ($\%B_f$, do inglês *percent bias*) e de discrepância ($\%D_f$, do inglês *percent discrepancy*). O $\%B_f$ trata-se de uma estimativa para avaliar a diferença média entre os valores observados e preditos pelo modelo, enquanto o $\%D_f$ é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados (BARANYI et al., 1999).

O conhecimento dos conceitos de microbiologia do leite e microbiologia preditiva são essenciais para estudos relacionados à inativação térmica do leite, já que através deles pode-se desenvolver e estudar modelos que descrevam o comportamento microbiano, e garantir a eficácia e otimização dos processos térmicos aplicados. Portanto, o objetivo geral deste estudo foi quantificar e modelar o comportamento dos micro-organismos na microbiota natural do leite cru pela aplicação de diferentes taxas de aquecimento.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção da amostra

As amostras de leite cru foram obtidas de produtores rurais da cidade de Jandaia do Sul – Paraná e transportadas em recipiente com isolamento térmico ao Laboratório de Microbiologia da UFPR – Campus Jandaia do Sul, onde foram submetidas ao tratamento térmico em diferentes taxas de aquecimento e passaram por análises laboratoriais. As amostras de leite utilizadas para cada um dos quatro experimentos de aquecimento foram coletadas em quatro dias diferentes.

2.2. Tratamento térmico

Os tratamentos térmicos foram realizados em banho térmico encamisado com circulação de água (Nova Técnica/NT 249, 1100 W) contendo 12 L de água destilada. A amostra de 2 L de leite cru foi submetida ao aquecimento em um béquer de vidro de 2 L até que atingisse a temperatura de 90 °C. Para a obtenção de diferentes taxas de aquecimento foram inseridas no banho térmico resistências térmicas adicionais de 500 W e 1000 W. Foram realizados quatro experimentos, cada qual com uma taxa de aquecimento: (i) 0,23 °C/min por uma hora, seguido por 0,73 °C/min; (ii) 0,80 °C/min, (iii) 1,31 °C/min, e (iv) 1,74 °C/min. No experimento com duas taxas de aquecimento diferentes, o leite foi aquecido lentamente a taxa de 0,23 °C/min até 42 °C para permitir o crescimento dos micro-organismos e, em seguida, o leite foi aquecido a taxa de 0,73 °C/min para causar a inativação térmica dos micro-organismos.

Os dados de temperaturas dos processos de aquecimento foram registrados por quatro sensores de temperatura do tipo bastão (PS-2143, Pasco Capstone) posicionados no centro da amostra, na água do banho térmico e nas paredes interna e externa do béquer.

2.3. Análises microbiológicas

2.3.1. Contagem padrão em placas

Em cada tratamento foram coletadas alíquotas das amostras em temperatura pré-determinados a partir de 25 °C. O método de referência, conforme

recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2022), para enumeração de mesófilos aeróbios viáveis é o de contagem padrão em placas, o qual foi utilizado neste estudo a fim de enumerar a concentração de bactérias totais (CBT) presentes no leite cru. Para o procedimento, uma alíquota de 1 mL da amostra foi pipetada utilizando uma micropipeta automática com ponteira estéril (1000 µL) e adicionada ao tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% esterilizada. Então, a mistura foi homogeneizada em vórtex (modelo 772, Fisatom) por 60 segundos. A partir da diluição inicial (10^{-1}) foram feitas as demais diluições necessárias.

Para a inoculação, foi semeada 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis e, em seguida, adicionado cerca de 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) fundido e mantido em banho térmico a 46-48 °C. O inóculo foi homogeneizado e posteriormente deixado para solidificar em superfície plana. Para a incubação, as placas foram levadas a estufa incubadora tipo BOD (Caltech) e mantidas invertidas a ± 36 °C por 48 h. Os micro-organismos que desenvolveram colônias foram enumerados manualmente, sendo o resultado expresso em UFC/mL de leite, levando-se em conta a diluição empregada.

2.4. Modelagem matemática

O modelo primário cinético de primeira ordem, apresentado na Equação (1), foi ajustado aos dados experimentais do estudo, em que $y = \log N$ (log UFC/mL) é o logaritmo da concentração microbiana em função do tempo t (min) e k (1/min) é a velocidade específica.

$$\frac{dy}{dt} = k \quad (1)$$

Em condições ambientais constantes, a velocidade específica, seja de crescimento ou de inativação, é constante. Entretanto, a velocidade específica é função de vários fatores, sendo que a temperatura é um dos fatores que tem maior impacto no crescimento e na inativação microbiana. Os modelos secundários podem descrever a dependência da velocidade específica em função da temperatura. Na literatura, normalmente são apresentados modelos que possuem dependência quadrática entre estas duas variáveis para a faixa de

temperaturas sub-ótimas (RATKOWSKY et al., 1982; WHITING; BUCHANAN, 1993). Para toda a faixa de temperaturas, modelos cúbicos podem ser utilizados. Dois modelos cúbicos foram testados neste estudo com o intuito de descrever a influência da temperatura (T) na velocidade específica dos micro-organismos presentes no leite cru.

Um dos modelos utilizados foi adaptado do modelo sugerido por Rosso et al. (1995), apresentado na Equação (2), onde $k_{ótimo}$ (1/min) é a velocidade específica na temperatura ótima de crescimento ($T_{ótima}$, °C), e T_{zero} (°C) é a temperatura em que a velocidade específica é zero.

$$k = k_{ótimo} \frac{(T - T_{zero})T^2}{T_{ótimo}(T_{ótimo}(T - T_{ótimo}) - (T_{ótimo} - T_{zero})(T_{ótimo} - 2T))} \quad (2)$$

Um modelo secundário empírico cúbico foi proposto neste estudo, apresentado na Equação (3), em que os parâmetros apresentam a mesma interpretação dos parâmetros apresentados na Equação (2).

$$k = k_{ótimo} \frac{(T_{zero} - T)(T - 2T_{ótimo} + T_{zero})}{T_{ótimo}^2 - 2T_{zero}T_{ótimo} + T_{zero}^2} \quad (3)$$

Devido ao caráter dos dados experimentais obtidos em condições não-isotérmicas, utiliza-se a Equação (1) (modelo primário) em conjunto com a Equação (2) ou (3) (modelo secundário) para descrever tanto o crescimento quanto a inativação microbiana sob condições variáveis de temperatura (VAN IMPE et al., 1992; FUJIKAWA et al., 2004).

2.5. Dados experimentais da literatura

Dados experimentais obtidos por Abduh e Setiani (2015) foram cedidos pelos autores por meio de comunicação pessoal (*e-mail*). Os dados foram utilizados para a validação dos modelos e parâmetros estimados neste estudo.

Abduh e Setiani (2015) quantificaram a redução das concentrações bacterianas de amostras de leite bovino em tratamentos térmicos que consideraram temperatura e tempo de pasteurização convencionais. Vinte amostras de leite de três produtores distintos foram submetidas ao aquecimento em diferentes taxas seguidas do binômio tempo-temperatura de 72° C por 15 s. Os dados experimentais foram agrupados em quatro diferentes conjuntos de dados (1 a 4), com base nas áreas sob as curvas de tempo-temperatura (*Under Curve Area – UCA*) para o cálculo dos índices estatísticos. Os conjuntos compreendem as seguintes amostras: conjunto 1 (3 amostras – Salatiga 1, 2 e 3), conjunto 2 (3 amostras – Salatiga 4 e Semarang L e K), conjunto 3 (4 amostras – Semarang 6D, 8D, 9D e 14D) e conjunto 4 (10 amostras – Boyolali 21 a 25, 27 a 31). Cada um dos conjuntos foi agrupado considerando o perfil similar de temperatura do tratamento térmico aplicado (taxas de aquecimento seguido de pasteurização e resfriamento das amostras).

2.6. Ajustes dos modelos e cálculo dos índices estatísticos

Os ajustes dos modelos aos dados experimentais e as análises estatísticas deste estudo foram realizados no *Microsoft Office Excel* com a ferramenta *solver*. O *solver* é um suplemento de análise de dados do *Excel* usado para a minimização de resíduos a partir de uma fórmula em uma célula, conforme restrições ou limites estabelecidos, sobre os valores de outras células variáveis da planilha (parâmetros do modelo a serem estimados). Os resultados dos ajustes do modelo proposto – Equação (3) e do modelo adaptado de Rosso et al. (1995) – Equação (2) foram comparados.

A capacidade dos modelos em descrever o comportamento microbiano no leite foi avaliada através de índices estatísticos, como a Raiz do Erro Quadrático Médio (*RMSE* – Equação (4)), o coeficiente de determinação (R^2 – Equação (5)), bem como os percentuais de tendência ($\%B_f$ – Equação (8)) e de discrepância ($\%D_f$ – Equação (10)) (BARANYI et al., 1999), baseados nos fatores *bias* (B_f – Equação (6)) e *accuracy* (A_f – Equação (9)) (ROSS, 1996). Nas Equações (4) a (10), pd_i e ob_i são os valores preditos pelo modelo e observados

experimentalmente, respectivamente; n é o número de observações, p é o número de parâmetros, e \overline{ob} é a média da variável de resposta observada.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (pd_i - ob_i)}{n - p}} \quad (4)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (ob_i - pd_i)^2}{\sum_{i=1}^n (ob_i - \overline{ob})^2} \quad (5)$$

$$B_f = \exp\left(\frac{\sum_{i=1}^n (\ln pd_i - \ln ob_i)}{n}\right) \quad (6)$$

$$\text{sgn}(\ln B_f) = \begin{cases} +1, & \text{se } \ln B_f > 0 \\ 0, & \text{se } \ln B_f = 0 \\ -1, & \text{se } \ln B_f < 0 \end{cases} \quad (7)$$

$$\%B_f = \text{sgn}(\ln B_f)(\exp|\ln B_f| - 1)100\% \quad (8)$$

$$A_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\ln pd_i - \ln ob_i)^2}{n}}\right) \quad (9)$$

$$\%D_f = (A_f - 1)100\% \quad (10)$$

Sobre a interpretação dos valores dos índices estatísticos, é possível observar que o coeficiente R^2 obtido deve ser positivo e quanto mais próximo da unidade for, tanto maior será a validade da regressão (ALEXANDER et al., 2015). Os resultados de $RMSE$ devem ser positivos e quanto mais próximo de zero for, maior a capacidade do modelo em representar os valores experimentais. Para a inativação microbiana, um valor de $\%B_f$ maior que 0% expressa uma falha segura do modelo, pois a inativação predita é menor que a observada, enquanto um valor de $\%B_f$ menor que 0% indica uma falha perigosa do modelo, pois a inativação predita é maior do que a observada (ROSS, 1996; BARANYI et al., 1999). Os resultados de $\%D_f$ são sempre maiores ou igual a 0%; quanto maior o valor, mais discrepante é a média das estimativas (BARANYI et al., 1999).

3. Resultados e Discussão

3.1. Modelagem do comportamento microbiano durante o tratamento térmico

O modelo matemático empírico proposto neste estudo foi ajustado aos dados dos quatro experimentos em diferentes taxas de aquecimento, conforme apresentado na Figura 1. O modelo ajustado foi apto a descrever a resposta dos micro-organismos em função do tempo nas diferentes taxas de aquecimento. A concentração inicial de bactérias totais presentes nos leites crus nos quatro experimentos de aquecimento variou entre 6,0 log UFC/mL e 7,5 log UFC/mL.

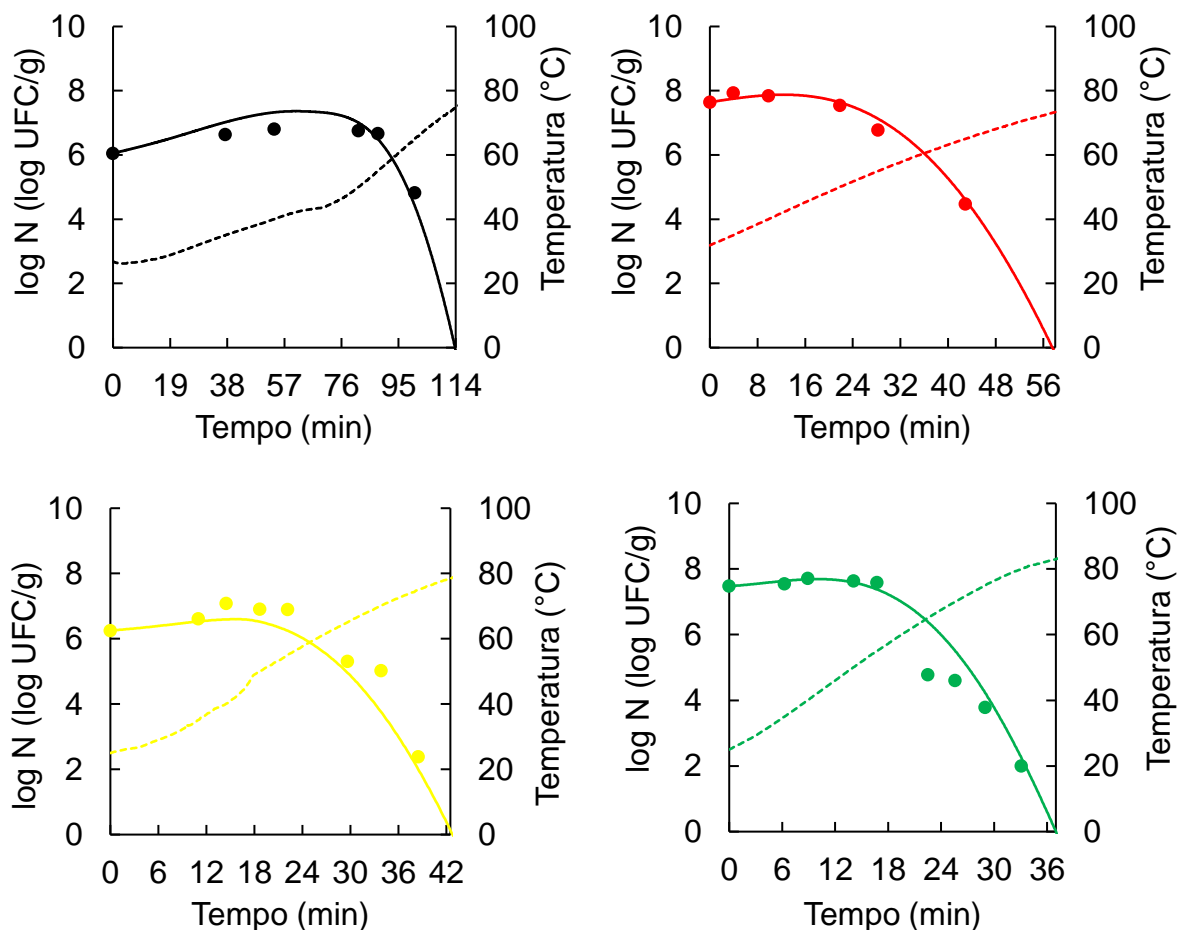


Figura 1. Modelo matemático empírico proposto neste estudo (linhas contínuas) ajustado aos dados experimentais (símbolos) do comportamento microbiano em experimentos com diferentes taxas de aquecimento (linhas tracejadas – preta: 0,23 °C/min e 0,73 °C/min; vermelha: 0,80 °C/min, amarela: 1,31 °C/min, verde: 1,74 °C/min).

Em geral, os dados experimentais e as curvas obtidas pelo ajuste do modelo empírico proposto neste estudo apresentaram aumentos na concentração de micro-organismos após o início dos experimentos, seguidos por inativações. O experimento com a menor taxa de aquecimento apresentou aumento teórico (descrito pelo modelo) de mais de um ciclo logarítmico (1,26 log UFC/mL) em relação à concentração inicial, o maior aumento quando comparado aos outros tratamentos. O aumento ocorreu após 59 minutos de tratamento. Nas outras taxas de aquecimento, os aumentos teóricos de concentração registrados nas populações foram de 0,19 log UFC/mL (após 12 minutos), 0,21 log UFC/mL (após 9,75 minutos) e 0,35 log UFC/mL (após 15,50 minutos). O modelo preditivo dinâmico, que descreve o crescimento seguido da inativação microbiana, foi aplicado devido ao tratamento térmico lento empregado, onde as amostras de leite foram expostas durante um tempo razoável às temperaturas não-letais aos micro-organismos. Além de não-letais, as temperaturas observadas durante o aquecimento são favoráveis ou ótimas para a proliferação de bactérias, sobretudo mesófilas, que se multiplicam rapidamente na faixa de 30 °C à 40 °C (MAIESKI, 2011), causando o aumento na concentração em relação ao início da inativação.

O tempo necessário para que cada tratamento térmico inative toda a população de bactérias do leite depende da taxa de aquecimento aplicada, conforme já era esperado. O modelo empírico proposto prediz que o tempo necessário para a inativação dos micro-organismos viáveis até a concentração menor que 1 UFC/mL (ou < 0 log UFC/mL) é de 113,8 min, 57,5 min, 42,7 min e 37,0 min nas taxas de aquecimento de 0,23 °C/min, 0,80 °C/min, 1,31 °C/min e 1,74 °C/min, respectivamente. É importante lembrar que as concentrações iniciais das diferentes amostras eram diferentes (variaram entre 6,0 log UFC/mL e 7,5 log UFC/mL), o que interfere no tempo necessário para inativar toda a população de bactérias.

O modelo matemático adaptado de Rosso et al. (1995) também foi ajustado aos dados dos quatro experimentos em diferentes taxas de aquecimento, conforme apresentado na Figura 2. O modelo adaptado de Rosso, assim como o modelo empírico proposto neste estudo, também foi apto a descrever a resposta dos micro-organismos em função do tempo nas diferentes taxas de

aquecimento. As curvas obtidas pelo ajuste do modelo adaptado de Rosso também apresentaram aumentos na concentração de micro-organismos após o início dos experimentos, seguidos por inativações. O modelo adaptado de Rosso prediz que o tempo necessário para a inativação dos micro-organismos viáveis até a concentração menor que 1 UFC/mL (ou $< 0 \log \text{UFC/mL}$) é de 113,7 min, 57,7 min, 42,6 min e 36,5 min nas taxas de aquecimento de $0,23 \text{ }^\circ\text{C/min}$, $0,80 \text{ }^\circ\text{C/min}$, $1,31 \text{ }^\circ\text{C/min}$ e $1,74 \text{ }^\circ\text{C/min}$, respectivamente. Esses valores preditos foram muito próximos dos valores preditos com o modelo empírico proposto neste estudo.

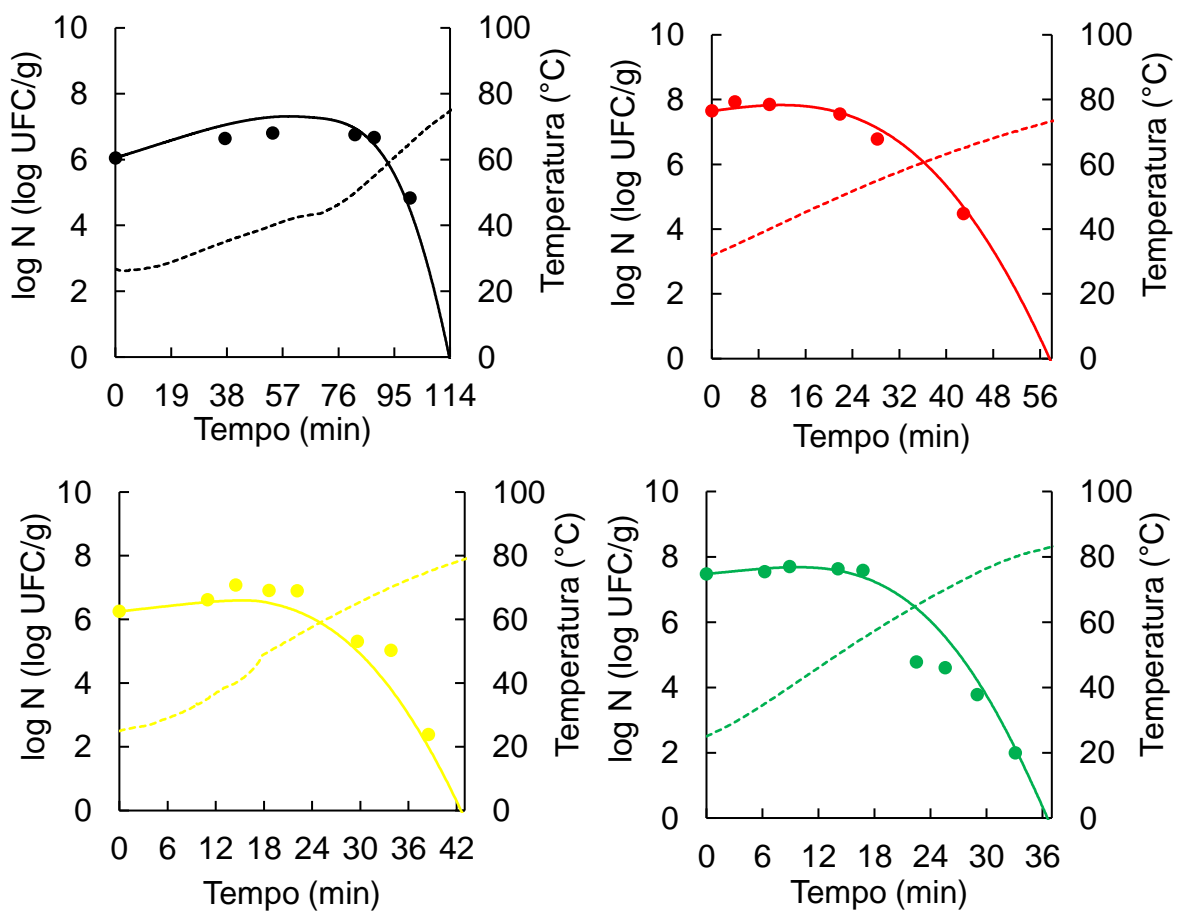


Figura 2. Modelo matemático adaptado de Rosso et al. (1995) (linhas contínuas) ajustado aos dados experimentais (símbolos) do comportamento microbiano em experimentos com diferentes taxas de aquecimento (linhas tracejadas – preta: $0,23 \text{ }^\circ\text{C/min}$ e $0,73 \text{ }^\circ\text{C/min}$, vermelha: $0,80 \text{ }^\circ\text{C/min}$, amarela: $1,31 \text{ }^\circ\text{C/min}$, verde: $1,74 \text{ }^\circ\text{C/min}$).

Os parâmetros cinéticos $k_{ótimo}$, $T_{ótimo}$ e T_{zero} estimados no ajuste de cada modelo aos dados experimentais são apresentados na Tabela 1. É possível observar que os valores dos parâmetros estimados dos modelos foram diferentes, embora razoavelmente próximos. O valor recíproco do parâmetro $k_{máx}$ pode fornecer uma estimativa do tempo médio de duplicação t_d (min) das células das bactérias presentes na microbiota natural do leite na temperatura ótima (ou seja, $t_d = 1/k_{máx}$). Desta forma, o tempo médio de duplicação estimado na temperatura ótima (27,5 °C para o modelo adaptado de Rosso e 31,2°C para o modelo empírico proposto) é em torno de 35 min.

Tabela 1. Parâmetros estimados no ajuste dos modelos empírico proposto neste estudo e adaptado de Rosso et al. (1995).

Modelo	$k_{ótimo}$ (1/min)	$T_{ótimo}$ (°C)	T_{zero} (°C)
Empírico	0,0286	31,2	42,2
Rosso	0,0282	27,5	41,7

3.2. Índices estatísticos do ajuste dos modelos aos dados experimentais

A qualidade do ajuste dos modelos matemáticos a cada um dos quatro conjuntos de dados experimentais nas diferentes taxas de aquecimento foi avaliada por meio dos índices estatísticos R^2 , $RMSE$, percentuais de tendência ($\%B_f$) e de discrepância ($\%D_f$). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Índices estatísticos (R^2 , $RMSE$, $\%B_f$ e $\%D_f$) resultantes dos ajustes dos modelos adaptado de Rosso et al. (1995) e empírico proposto neste estudo.

Taxas de aquecimento	R^2		$RMSE$		$\%B_f$		$\%D_f$	
	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*
0,23 °C/min e 0,73 °C/min	0,949	0,955	0,321	0,335	0,8	0,8	5,4	5,7
0,80 °C/min	0,986	0,985	0,182	0,173	1,2	1,2	3,0	2,6
1,31 °C/min	0,950	0,947	0,564	0,586	-9,9	-10,4	13,7	14,3
1,74 °C/min	0,925	0,933	0,655	0,644	7,2	7,8	13,2	13,5

*Emp.: modelo empírico proposto neste estudo.

De forma geral, os modelos apresentaram índices estatísticos muito semelhantes. A comparação do modelo empírico que está sendo proposto com um modelo reconhecido na literatura é de suma importância para sua validação. Os valores de R^2 e $RMSE$ indicam que os modelos demonstraram melhor ajuste aos dados da taxa de aquecimento de 0,80 °C/min. Os percentuais de tendência e de discrepância são importantes indicadores da confiabilidade dos modelos preditivos. A partir da análise desses valores, suas falhas podem ser classificadas entre perigosas (*fail-dangerous*) ou seguras (*fail-safe*) (ROSS, 1996; BARANYI et al., 1999). Falhas na descrição do comportamento dos microorganismos foram observadas nos dois modelos testados, tanto a partir da análise visual das curvas quanto pela avaliação dos valores de $\%B_f$ e $\%D_f$, sendo que os valores desses índices foram semelhantes entre os modelos, assim como foi observado para os índices R^2 e $RMSE$.

O experimento a uma taxa de aquecimento de 1,31 °C/min foi o único em que os modelos proposto neste estudo e adaptado de Rosso et al. (1995) apresentam falhas perigosas na predição. Ambos superestimaram o tratamento térmico, apresentando percentuais de tendência de -10,4% e -9,9%,

respectivamente, indicando que a resistência dos micro-organismos ao aquecimento é menor, e assim a inativação é alcançada em um tempo e temperatura inferior ao que realmente se observa na prática.

3.3. Índices estatísticos da validação dos modelos com dados da literatura

As predições dos modelos proposto neste estudo e adaptado de Rosso et al. (1995) e os dados experimentais de Abduh e Setiani (2015) para as diferentes taxas de aquecimento, pasteurização e resfriamento das amostras são apresentadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Os valores dos índices estatísticos $RMSE$, $\%B_f$ e $\%D_f$ obtidos da comparação dos modelos aos dados experimentais são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores dos índices estatísticos $RMSE$, $\%B_f$ e $\%D_f$ obtidos da comparação dos modelos adaptado de Rosso et al. (1995) e empírico proposto neste estudo aos dados experimentais de Abduh e Setiani (2015).

Amostras	$RMSE$		$\%B_f$		$\%D_f$	
	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*	Rosso	Emp.*
Conjunto 1	0,560	0,580	-10,6	-12,1	27,3	28,1
Conjunto 2	1,820	1,780	47,6	46,3	51,4	50,2
Conjunto 3	1,745	1,674	74,8	67,7	76,4	72,7
Conjunto 4	1,305	1,277	12,1	9,3	42,5	42,2

*Emp.: modelo empírico proposto neste estudo.

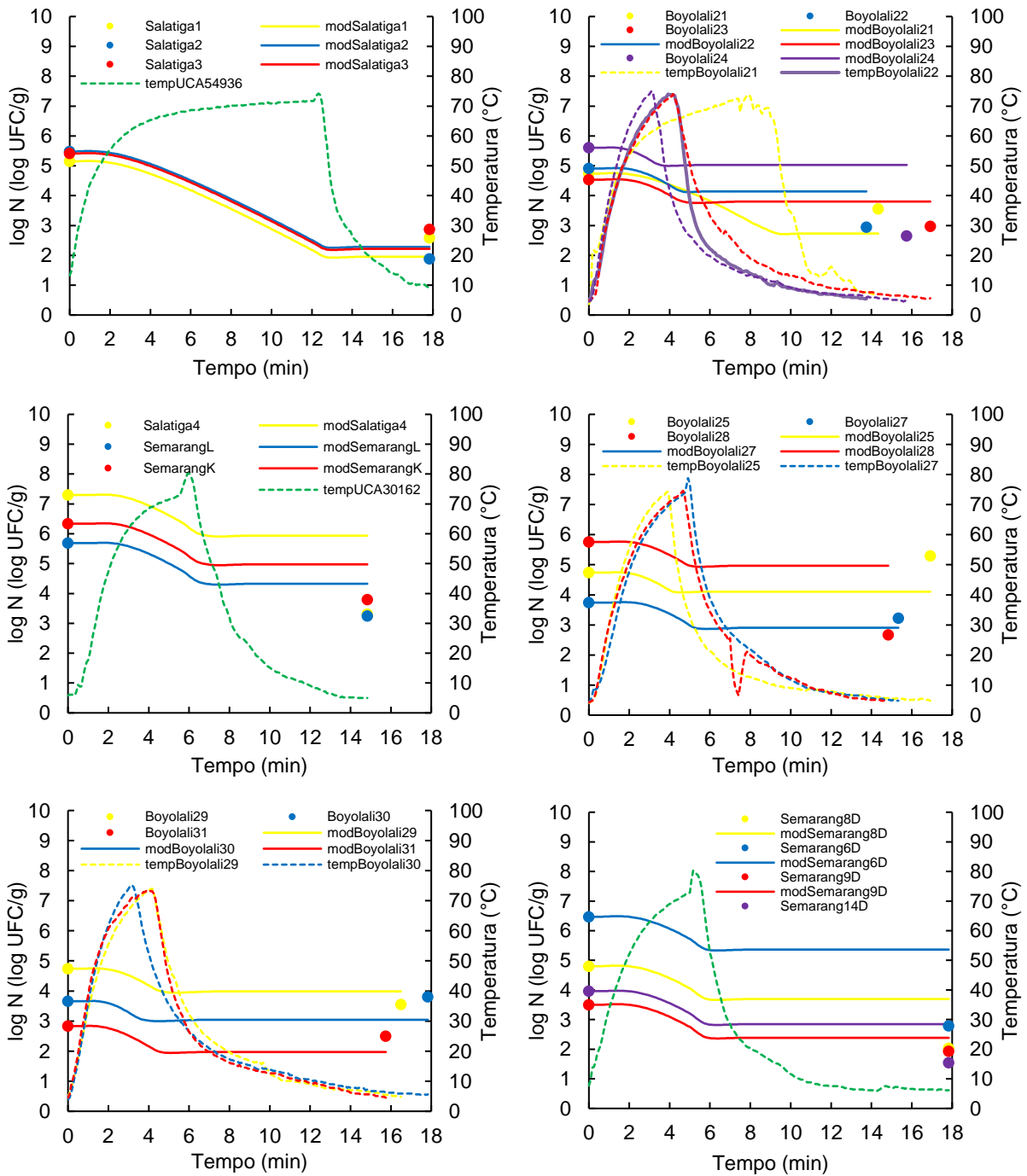


Figura 3. Predições do modelo proposto neste estudo (linhas contínuas) e comparação com os dados experimentais (símbolos) de Abduh e Setiani (2015) para diferentes taxas de aquecimento, pasteurização e resfriamento das amostras (linhas tracejadas).

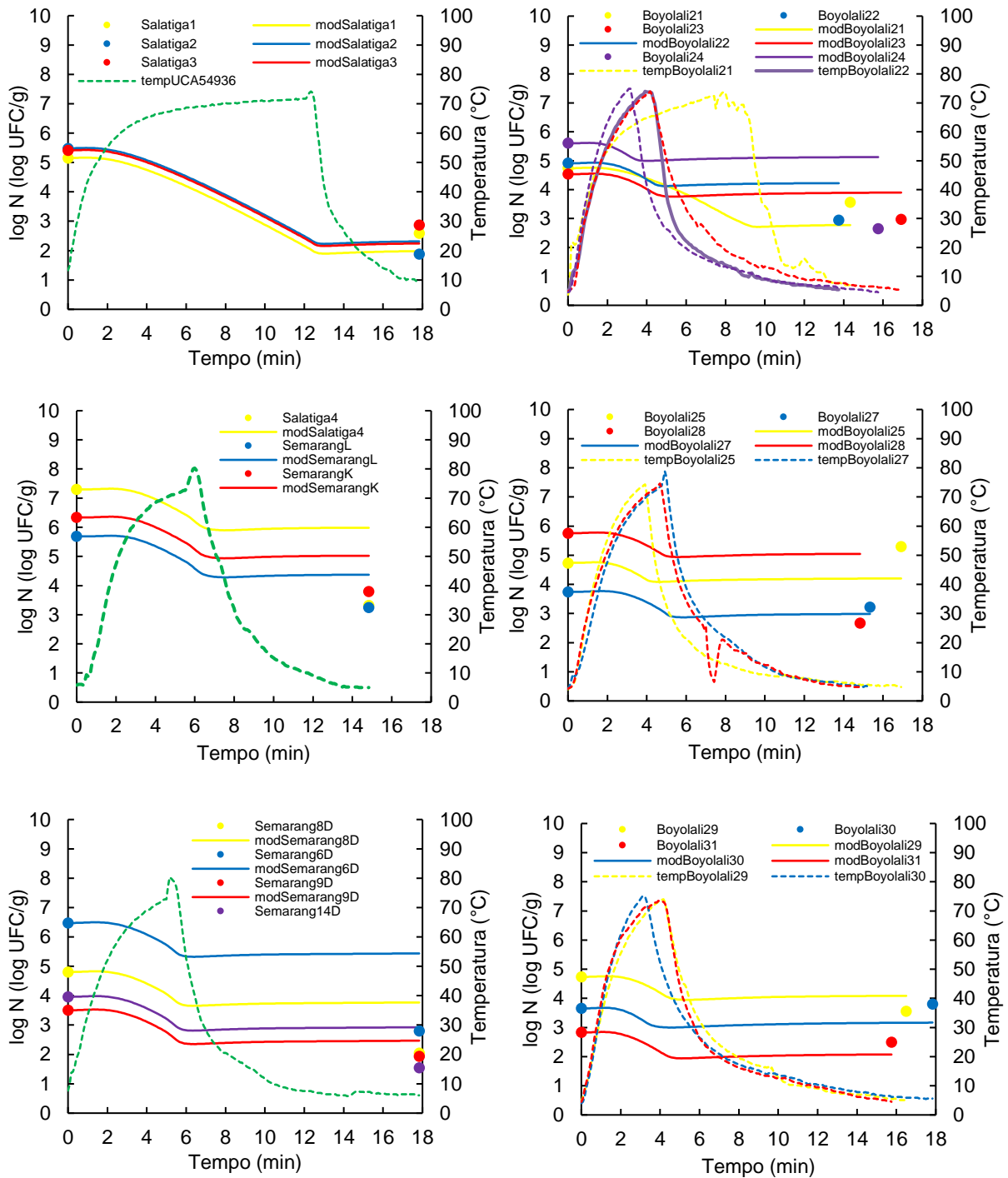


Figura 4. Predições do modelo adaptado de Rosso et al. (1995) (linhas contínuas) e comparação com os dados experimentais (símbolos) de Abduh e Setiani (2015) para diferentes taxas de aquecimento, pasteurização e resfriamento das amostras (linhas tracejadas).

Os modelos apresentaram índices estatísticos semelhantes entre si para cada conjunto de amostras. Essa similaridade foi observada anteriormente nos ajustes dos modelos aos dados experimentais deste estudo. Analisando os valores de *RMSE*, é possível observar que as predições mais assertivas foram obtidas em relação aos dados do Conjunto 1 (Salatiga 1, 2, 3). Os menores percentuais de discrepância também foram obtidos para o conjunto 1. No entanto, os percentuais de tendência obtidos para o conjunto 1 foram menores que zero, indicando falhas perigosas na predição (BARANYI et al., 1999).

Em geral, quanto maior a *UCA* – área sob a curva de tempo-temperatura, melhores foram as predições do comportamento microbiano pelos modelos matemáticos. Isso ocorre porque os parâmetros do modelo proposto foram estimados para curvas de aquecimento lento, que representam maiores valores de *UCA*, como pode ser observado de forma comparativa nas Figuras 1 e 3, ou Figuras 2 e 4. Por isso, os modelos demonstraram predições com menores discrepância aos perfis de temperatura com menores taxas de aquecimento, como os perfis agrupados no conjunto 1, que são semelhantes aos perfis de temperatura lentos testados neste estudo.

4. Conclusão

As diferentes taxas de aquecimento aplicadas experimentalmente interferiram no comportamento dos micro-organismos. Em temperaturas moderadas (até ~42 °C), observou-se o crescimento microbiano em todos os experimentos. Os modelos matemáticos adaptado de Rosso et al. (1995) e proposto neste estudo foram ajustados aos dados experimentais obtidos neste estudo, obtiveram índices estatísticos semelhantes entre si (R^2 , *RMSE*, % B_f e % D_f), o mesmo ocorreu para as predições dos modelos aos dados experimentais de Abduh e Setiani (2015). A semelhança observada nas predições de ambos os modelos para um mesmo grupo de dados nos permite concluir a validade do modelo empírico proposto em prever a inativação térmica dos micro-organismos em diferentes condições de aquecimento, visto que a predição deste se compara à obtida por um modelo clássico da literatura.

Portanto, os modelos sugeridos podem ser úteis na análise de processos de inativação térmica da microbiota natural do leite.

5. Referências

- ABDUH, S. B. M.; SETIANI, B. E. The reduction of aerobic bacterial counts of bovine milk as influenced by heat-treatments at pasteurization temperatures. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 465-472, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.051>
- ALEXANDER, D. L. J.; TROPSHA, A.; WINKLER, D. A. Beware of R²: simple, unambiguous assessment of the prediction accuracy of QSAR and QSPR models. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 7, p. 1316-1322, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00206>
- BARANYI, J.; PIN, C.; ROSS, T. Validating and comparing predictive models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 159-166, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00035-5)
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 199-218, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-L)
- BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 2017. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm (acessado 18 abril 2023).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018**. Brasília, 2018. <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=30/11/2018&jornal=515&pagina=10> (acessado 18 abril 2023).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos Oficiais para Análises de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 2022. 1ª ed. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacao-metodos-da-rede-lfda/poa/metodos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal-_1a_ed-_2022_assinado.pdf (acessado 18 abril 2023).
- CHANDLER, R. E.; MCMEEKIN, T. A. Temperature function integration and the prediction of the shelf-life of milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 40, n. 1, p. 10-13, 1985.
- CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Processamento de leites de consumo**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

DALGAARD, P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 305-317, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00136-T](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00136-T)

DAVANÇO, F. V.; HARA, E. T.; SATO, R. T.; SIVIERI, K.; REZENDE, C. M.; RENSIS, C. M. V. B. Avaliação do efeito do tratamento térmico na capacidade de retenção de água do iogurte através da metodologia de superfície de resposta. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 3-7, 2009.

DAVEY, K. R. Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n. 3, p. 253-257, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02933.x>

DUH, Y.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, v. 56, n. 3, p. 205-210, 1993. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.3.205>

EMBRAPA. **Anuário leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**. Embrapa gado de leite. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 104 p. 2019.

FAO. Milk and dairy products in human nutrition. Roma, 2013. <https://www.fao.org/documents/card/fr/c/5067e4f2-53f8-/> (acessado 18 abril 2023).

FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S. A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 501-509, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.007>

GRIFFITHS, M. W. Predictive modelling: applications in the dairy industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 305-315, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90159-7)

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive microbiology: a review. **Biocontrol Science**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2003. <https://doi.org/10.4265/bio.8.1>

MAIESKI, L. M. **Os principais microorganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite**. Trabalho de conclusão de Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, 2011.

MCCLURE, P. J.; BLACKBURN, C. W.; COLEA, M.B.; CURTIS, P.S.; JONES, J. E.; LEGAN, J. D.; OGDENE, I. D.; PECKF, M. W.; ROBERTSON, T. A.; SUTHERLAND, J. P.; WALKER, S. J. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach.

International Journal of Food Microbiology, v. 23, n. 3-4, p. 265-275, 1994. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90156-2)

MCMEEKIN, T. A., BROWN, J., KRIST, K., MILES, D., NEUMEYER, K., NICHOLS, D. S., e SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: a basis for food safety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 541, 1997. <https://doi.org/10.3201/eid0304.970419>

RATKOWSKY, D. A., OLLEY, J., McMEEKIN, T. A., BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1-5, 1982. <https://doi.org/10.1128/jb.149.1.1-5.1982>

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501-508, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>

ROSSO, L., LOBRY, J. R., BAJARD, S., & FLANDROIS, J. P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610-616, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.610-616.1995>

SAVELLO, P. A., DARGAN, R. A. Reduced yogurt syneresis using ultrafiltration and very-high temperature heating. **Milchwissenschaft**, v. 52, p. 573-577, 1997.

TATINI, S. R., MEKALA, P., EL-HABAZ, A., GRIFFITHS, M. W. Rapid detection of psychrotrophic bacteria in manufacturing grade raw milks. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 11, p. 861-867, 1991. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.11.861>

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção de qualidade do leite**. 5ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2013.

VAN IMPE, J. F., NICOLAÏ, B. M., MARTENS, T., DE BAERDEMAEKER, J., VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2901-2909, 1992. <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.2901-2909.1992>

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 10, p. 175-177, 1993. <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1017>

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Rosângela Maria Barbosa Gazola e a Gabriela Campaner Salmazo, pelo auxílio na execução dos experimentos; e a Universidade Federal do Paraná – *Campus* Avançado de Jandaia do Sul, pela cessão da estrutura física e materiais de consumo utilizados nos experimentos.

Autores

Vanessa Carolina Martins Prina, Daniel Angelo Longhi*

Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Rua Dr. João Maximiano, 426, Vila Operária, 86900-000, Jandaia do Sul, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência: ealdaniel@ufpr.br