



**Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Campus Maracanã, Rio de Janeiro, RJ**

Jéssica Barbosa Portela

**CONSTRUÇÃO DE MODELO PREDITIVO PARA INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA* EM
FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS UTILIZANDO MICRO-ONDAS.**

Rio de Janeiro, RJ

2017

Jéssica Barbosa Portela

Desenvolvimento de modelo preditivo para inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando micro-ondas.

Tese de Mestrado (Desenvolvimento de modelo preditivo para inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando micro-ondas.) apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadores: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz.

Prof^a. Dra. Janaína dos Santos Nascimento.

Rio de Janeiro, RJ

2017

Portela, Jéssica Barbosa

Desenvolvimento de modelo preditivo para inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando micro-ondas/ Jéssica Barbosa Portela, 2017. 56 p.

Orientadores: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz / Prof^a. Dra. Janaína dos Santos Nascimento.

Tese Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Programa de Pós-graduação Stricto Sensu, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2017. 1. Microbiologia Preditiva. 2. Fórmulas lácteas Infantis. 3. *Salmonella*. I. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação Stricto Sensu. II. Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz / Prof^a. Dra. Janaína dos Santos Nascimento. III. Desenvolvimento de modelo preditivo para inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando micro-ondas.

Jéssica Barbosa Portela

Desenvolvimento de modelo preditivo para inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando micro-ondas.

Tese de Mestrado (Desenvolvimento de modelo preditivo para inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando micro-ondas.) apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data de aprovação: 20 de Fevereiro de 2017.

Prof^a. Dra. Maria Carmela Kasnowski Holanda
Universidade Federal Fluminense

Prof^a.Dra. Aline Garcia dos Santos Gomes
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Denise Rosane Perdomo Azevedo
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, RJ

2017

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a minha família por serem parte de todos os momentos da minha vida, sempre me apoiando não importando as circunstâncias. E principalmente aos meus pais, Dilma e Gilmar, que me deram o dom da vida e sempre me ofereceram o melhor que puderam.

Agradeço aos meus orientadores, Adriano Gomes e Janaína dos Santos por acreditarem na minha capacidade de aceitar e alcançar todos os objetivos. Ao Leandro Cappato por toda paciência ao me apresentar ao GinaFiT. Ao Prof. Anderson de Souza e a Prof^a. Verônica Alvarenga, que mesmo de longe, conseguiram de forma brilhante, auxiliar na modelagem deste trabalho.

Cito com muito carinho de todos os monitores, técnicos e professores do laboratório de microbiologia do IFRJ, que são sempre solícitos a todos e lembro de todas as noites que desenvolvi meus experimentos com muitos risos e alegria, nas conversas, nos experimentos que davam errado, na lavagem de vidrarias até as 23:00 horas...Enfim por todos demonstrarem amor pelo que fazem e compartilhar esses momentos com os demais.

Aos amigos que trabalharam comigo, e que me diziam a todo momento que mesmo conciliando trabalho e estudo, tudo daria certo. Em especial ao Pablo Coimbra que participou de todos, eu digo todos os experimentos ao meu lado, nos erros e acertos.

Por fim, agradeço a todos os que, caminhando a meu lado, acreditaram que era possível.

:

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”
São Francisco de Assis

PORTELA, Jéssica Barbosa. Desenvolvimento de modelo preditivo para inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando micro-ondas. –51 p. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

RESUMO

O crescente número de casos de infecções e óbitos de crianças que se encontram internadas em hospitais tem sido relacionadas com a veiculação de microrganismos patogênicos através da alimentação, principalmente microrganismos pertencentes à família *enterobacteriaceae*. Esta problemática salienta a necessidade de melhorias no processo de preparo desses alimentos nos lactários, onde comumente é utilizado o banho maria como forma de tratamento térmico das fórmulas lácteas infantis. O uso de métodos alternativos ao tratamentos térmico aplicado aos alimentos é alvo de diversos estudos, uma vez que promovem a qualidade microbiológica, mantendo uma melhor qualidade sensorial e nutricional. Tais técnicas tem como destaque a tecnologia de barreiras, as micro-ondas e o ultrassom. Por outro lado, a microbiologia busca através do uso da matemática aliada a estudos experimentais, criar modelos que descrevam o comportamento microbiano a um determinado tratamento, permitindo que métodos seguros e passíveis de serem reproduzidos sejam facilmente descritos. Pouco é citado na literatura a respeito de estudos envolvendo pesquisa de *Salmonella* em fórmulas infantis, embora esta esteja sendo envolvida neste tipo de contaminação. Sendo assim, este estudo visou estabelecer o comportamento deste patógeno frente a aplicação de micro-ondas através do uso da microbiologia preditiva. Os resultados demonstraram que a exposição de micro-ondas a *Salmonella* nos tratamentos a 20W (750 s), 40W (90 s), 60W (120 s) e 80W (120 s), tiveram reduções de 9,22; 9,59; 8,23 e 8,57 log UFC*mL⁻¹ respectivamente, com um aumento máximo de temperatura 110,2°C. Para o modelo primário de inativação, observou-se inicialmente um perfil bifásico e em potências maiores o modelo log-linear. De outro modo, para a modelagem secundária foi utilizado o modelo da raiz quadrada, resultando na equação: $\sqrt{km_{\max}} = 0,0055 (P + 9,98)$, que pôde ser avaliado através do coeficiente de correlação (R²), do erro quadrático médio (MSE), do fator bias e da exatidão, apresentando ótimos resultados. Desta forma, os modelos demonstraram eficácia na inativação da *Salmonella*, garantindo um alto nível de segurança as fórmulas.

Palavras Chave: Microbiologia Preditiva, Fórmula Láctea Infantil, *Salmonella*.

PORTELA, Jéssica Barbosa. Development of a predictive model for inactivation of *Salmonella* in infant milk formulas using microwaves. 51 p. Master's thesis. Stricto Ssensu Graduate Program, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

ABSTRACT

The increasing number of cases of infections and deaths of children hospitalized in hospitals has been related to the transmission of pathogenic microorganisms through food, mainly microorganisms belonging to the enterobacteriaceae family. This problem highlights the need for improvements in the preparation process of these foods in the lactarios, where the water bath is commonly used as a form of thermal treatment of infant formula. The use of alternative methods to the heat treatments applied to food is the target of several studies, since they promote the microbiological quality, maintaining a better sensorial and nutritional quality. Such techniques have as a highlight the technology of barriers, the microwaves and the ultrasound. On the other hand, microbiology searches through the use of mathematics combined with experimental studies, to create models that describe the microbial behavior of a particular treatment, allowing safe and reproducible methods to be easily described. Little is mentioned in the literature regarding studies involving *Salmonella* research in infant formulas, although it is being involved in this type of contamination. Therefore, this study aimed to establish the behavior of this pathogen against the application of microwave through the use of predictive microbiology. The results showed that microwave exposure to *Salmonella* in treatments at 20W (750 s), 40W (90 s), 60W (120 s) and 80W (120 s) had reductions of 9.22, 9.59, 8.23 and 8.57 log CFU * mL⁻¹ respectively, with a maximum temperature rise of 110.2 ° C. For the primary model of inactivation, a biphasic profile was initially observed, and in larger powers the log-linear model. Otherwise, for the secondary modeling the square root model was used, resulting in the equation: $\sqrt{k_{\text{máx}}} = 0.0055 (P + 9.98)$, which could be evaluated through the correlation coefficient (R²), the quadratic error (MSE), bias factor and accuracy, with excellent results. In this way, the models demonstrated efficacy in the inactivation of *Salmonella*, ensuring a high level of safety of the formulas.

Keywords: Predictive Microbiology, Infant Milk Formula, *Salmonella*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 Composição do leite materno e do leite de vaca	14
Figura 2.2 Valores mínimos e máximos de nutrientes exigidos pela legislação para fórmulas infantis	15
Figura 2.3 Procedimento padrão em lactários	16
Figura 2.4 Unidades de forno micro-ondas vendidos nos anos 90	21
Figura 5.1 Modelos matemático GlnaFiT	30
Gráfico 6.1 Perfil de variação de temperaturas ao longo do tempo	35
Gráfico 6.2: Melhores modelos ajustados no GlnaFiT	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Estirpes de Referência	27
Tabela 5.2 Potências e tempos utilizados nos experimentos	29
Tabela 5.3 Modelos e equações disponíveis no GlnaFiT	31
Tabela 5.4 Equações dos parâmetros de correlação dos ajustes	32
Tabela 6.1 Contagem microbiana de <i>Salmonella</i> Typhi nas amostras de fórmula láctea Infantil	34
Tabela 6.2 Temperaturas das amostras de fórmula láctea infantil submetidas aos tratamentos em micro-ondas	36
Tabela 6.3 Melhores ajustes aos modelos do GlnaFiT	38
Tabela 6.4 Dados utilizados para a validação	40
Tabela 6.5 Parâmetros da cinética de inativação das cepas da validação	40
Tabela 6.6 Dados e resultados da regressão linear para obtenção do valor z	41
Tabela 6.7 Dados para ajuste ao modelo secundário	42
Tabela 6.8 Dados do modelo secundário de inativação	42
Tabela 6.9 Dados resultantes da validação do modelo secundário	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS	13
2.2. LACTÁRIOS	16
2.3 <i>SALMONELLA</i>	16
2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	18
2.4.1 Modelos preditivos	19
2.5 TECNOLOGIAS EMERGENTES	20
2.6 MICRO-ONDAS	21
2.6.1 Esterelização por micro-ondas	22
2.7 MICROBIOLOGIA PREDITIVA, MICRO-ONDAS E FORMULAS LÁCTEAS INFANTIS	24
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVOS	26
4.1. OBJETIVO GERAL	26
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1. ESTIRPE	27
5.1.1. Preparo dos inóculos	28
5.2. FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS	28
5.3. CONDIÇÕES DE AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> EM MICRO-ONDAS	28
5.4. CONTAGEM DE <i>SALMONELLA</i>	28
5.5. DESENVOLVIMENTO DOS MODELO DE INATIVAÇÃO	30
5.5.1 Modelos preditivos primários e construção das curvas de inativação	30
5.5.2 Desenvolvimento do modelo preditivo secundário	32
5.5.3 Validação da metodologia	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6.1 CONTAGEM MICROBIOLÓGICA	33
6.2 TEMPERATURAS DURANTE OS TRATAMENTOS	35
6.3 AJUSTES AOS MODELOS DE INATIVAÇÃO PRIMÁRIOS	37
6.4 AJUSTE AO MODELO SECUNDÁRIO E VALIDAÇÃO	39

6.4.1 Dados para a validação	39
6.4.2 Ajustes ao modelo secundário de inativação secundário	42
6.4.3 Validação	42
7 CONCLUSÃO	43
8 SUGESTÕES FUTURAS	44
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

As fórmulas lácteas infantis são utilizadas como substitutos do leite materno na alimentação de crianças na primeira infância. Essas fórmulas são suscetíveis à contaminação microbiana durante o seu preparo e manuseio.

Os principais microrganismos associados a contaminações nestes alimentos são *Salmonella* e *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*spp) (Comunidade Européia (CE), 2005). Quadros de infecções e óbitos estão associados ao consumo potencialmente carreador de patógenos e a detecção de patógenos viáveis nas fórmulas reconstituídas, mesmo após terem passado por algum processo de reaquecimento, salientam as falhas existentes na preparação dessas fórmulas e a necessidade de melhorias (HA & KANG, 2014).

A microbiologia preditiva tem por objetivo demonstrar através de modelos a resposta microbiana a fatores ambientais e a partir de uma modelagem matemática, tornar este comportamento microbiano similarmente reprodutível sob as mesmas condições. Um grande número de pesquisas e adequações deste conceito a processos surgem na tentativa de obter produtos de qualidade e segurança. O que não seria diferente nas preparações em lactários.

O uso de novas tecnologias no processamento de alimentos tornam-se de suma importância por promoverem o mínimo de alterações sensoriais e nutricionais, com segurança microbiológica, maior validade comercial, minimizando os efeitos bioquímicos indesejáveis (NOVAES *et al.*, 2012). Por sua vez, a microbiologia preditiva pode estar associada a um novo processamento tecnológico para que se obtenham modelos matemáticos capazes de descrever a real necessidade no preparo e obtenção de fórmulas infantis de qualidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS

A utilização de fórmulas infantis atinge popularidade no século XX com o crescimento do advento da incorporação da mulher no mercado de trabalho, sendo este período marcado pelo grande desenvolvimento urbano e industrial (GURMINI e VIEIRA, 2002; VINAGRE *et al.*, 2001). Atualmente uma gama de substitutos do leite materno está disponível no mercado, apresentando-se majoritariamente sob a forma de pó a base de leite, elaboradas a partir de leite de vaca e de outros mamíferos.

No Brasil e em todos os países de economia capitalista, com a mudança comportamental da mulher, verificava-se simultaneamente uma diminuição do aleitamento tradicional, devido ao processo de urbanização e ao crescente uso de propagandas e apoio de médicos que supervalorizavam o uso destes produtos. (REA, 1990; BOSI E MACHADO, 2005).

O aleitamento artificial é introduzido nas situações em que o aleitamento materno não é indicado, tais como na presença de microrganismos ou substâncias que possam comprometer a saúde e a vida do bebê. E ainda por escolha da mulher que opta por não amamentar ou que não dispõem de leite materno para amamentar os filhos por todo o tempo que desejariam. (LACERDA & ACCIOLY, 2010).

Os substitutos mais utilizadas no mercado têm como matéria-prima básica o leite de vaca. Por sua vez, este não é apropriado para a alimentação do recém-nascido, necessitando de uma série de adaptações para se tornar mais digerível e absorvível (ÁLVAREZ, 2013).

As principais modificações feitas incluem a redução do teor de proteínas e eletrólitos, substituição de parte dos lipídios por óleo vegetal, adição de outros carboidratos como a maltodextrina e a sacarose e adição de vitaminas e minerais. As fórmulas também não deve conter farinha, amido, mel, espessantes ou adoçantes (ÁLVAREZ, 2013)

O leite humano e de vaca diferem entre si na quantidade e qualidade dos seus componentes, conforme apresenta a figura 2.1, determinando diferenças na nutrição e proteção do recém-nascido (ACCIOLY *et al.*, 2005).

	LEITE HUMANO			LEITE DE VACA
	Colostro	Transição	Maduro	
Água (g/dl)	87,2	86,4	87,6	87,3
Energia (kcal/dl)	58	74	71	69
Sólidos totais (g/dl)	12,8	13,6	12,4	12,7
Minerais	0,33	0,24	0,21	0,72
Gorduras	1,85 a 2,9	2,9 a 3,6	3,0 a 3,8	3,7
Lactose	5,3	6,6	7	4,8
Proteínas totais	2,7	1,6	1,2	3,3
Frações protéicas (g/dl)				
Caseína	1,2	0,7	0,25	2,8
Lactalbumina	-	0,8	0,3	0,2
Lactoglobulina	-	-	-	0,4
Minerais				
Sódio (mEq/l)	21	13	7	25
Potássio (mEq/l)	19	16	14	35
Cloreto (mEq/l)	26	15	12	29
Cálcio (mg/dl)	31 a 32	29 a 34	28 a 33	125
(mEq/l)	15,5 a 16	14,5 a 17	14 a 16,5	62,4
Magnésio (mg/dl)	3 a 4	2,7 a 4	3 a 4	12
(mEq/l)	2,5 a 3,3	2,2 a 3,3	2,5 a 3,3	10
Fósforo (mg/dl)	12 a 14	15 a 17	13 a 15	96
Sulfato (mg/dl)	22	20	14	30
Ferro (mg/dl)	0,09	0,04	0,15	0,1
Iodo (mg/dl)	0,012	0,002	0,007	0,021
Cobre (mg/dl)	0,05	0,05	0,04	0,03
Zinco (mg/dl)	0,5 a 0,96	0,32 a 0,46	0,25 a 0,37	0,38

Fonte: Adaptação de Calil et al, 1991.

Figura 2.1: Composição do leite materno e do leite de vaca

Segundo a ANVISA (2011), fórmula Infantil é um produto desenvolvido para lactentes, podendo apresentar-se como pó ou líquido. Devendo ser usado sob prescrição, sob a forma de alimentação única, satisfazendo todas as necessidades nutricionais de um lactente sadio (crianças de zero a doze meses incompletos), podendo ser classificadas em fórmula infantil de partida e de seguimento.

A fórmula infantil de partida é um produto destinado a lactentes sadios a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos. Já as classificadas como de seguimento são destinadas para crianças lactentes de primeira infância (BRASIL, 2011).

A figura 2.2 apresenta as quantidades de cada nutriente nas composições de partida e seguimento, de acordo com a legislação vigente.

NUTRIENTE	Unidade de Medida	Leite de Partida		Leite de Seguimento	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Valor Energético em 100mL	kcal	60	70	60	70
Carboidratos	G	9,0	14,0	9,0	14,0
Lactose	G	4,5	-	4,5	-
Proteína do leite de vaca hidrolisadas e não hidrolisadas	G	1,8	3,0	1,8	3,5
Proteínas isoladas de soja	G	2,25	3,0	2,25	3,5
Mistura de leite de vaca e de soja	G	2,25	3,0	2,25	3,5
Gorduras totais	G	4,4	6,0	4	6
Ácido Linoléico	mg	300	1400	300	1400
Ácido α -linoléico	mg	50	-	50	-
Sódio	mg	20	60	20	60
Cálcio **	mg	50	-	50	-
Ferro	mg	0,45	1,3	0,9	2,0
Potássio	mg	60	180	60	180
Cloreto	mg	50	160	50	160
Fósforo	mg	25	-	25	-
Magnésio	mg	5	-	5	-
Iodo	Mg	10	-	10	-
Cobre	Mg	35	-	35	-
Zinco	mg	0,5	-	0,5	-
Selênio	Mg	1	-	1	-
Manganês	Mg	1	-	1	-
Vitamina A***	μ g RE	60	180	60	180
Vitamina D3	Mg	1	2,5	1	3
Vitamina E	mg α -TE	0,5	-	0,5	-
Vitamina K	Mg	4	-	4	-
Vitamina C	mg	10	-	10	-
Niacina	Mg	300	-	300	-
Vitamina B6	Mg	35	-	35	-
Ácido Fólico	Mg	10	-	10	-
Ácido Pantotênico	Mg	400	-	400	-
Vitamina B12	Mg	0,1	-	0,1	-
Biotina	Mg	1,5	-	1,5	-
Colina	mg	7	-	7	-
Taurina	mg	-	12	-	12
L-Carnitina	0mg	1,2	-	-	-

Fonte: ANVISA, 2011.

Figura 2.2: Valores mínimos e máximos de nutrientes exigidos pela legislação para fórmulas infantis.

Este tipo de alimento geralmente é utilizado como as únicas fontes de nutrientes para crianças menores de um ano condicionadas a internação em hospitais. Sendo assim, é de extrema importância que supram às necessidades nutricionais do paciente e que sejam microbiologicamente seguros, uma vez que as infecções que ocorrem ao longo do primeiro ano de vida são as principais causas da elevação do índice de mortalidade entre os lactente (Santos RFS, 2009).

As infecções relacionadas ao consumo de fórmulas infantis estão em maioria associadas a microrganismos da família *Enterobacteriaceae* (ROSSI *et al.*, 2010). Segundo regulamento nº 2073/2005 da Comunidade Européia, os principais alvos de preocupação são *Salmonella* e *Enterobactersakazakii* (*Cronobacter* spp).

As principais causas de contaminação ocorrem devido à veiculação de patógenos de forma acidental durante ou após a reconstituição do produto.

2.2 LACTÁRIOS

Lactários são unidades hospitalares de preparo e distribuição da alimentação de lactentes, nestes são preparadas fórmulas infantis e complementares. Assim como todo serviço de alimentação, os lactários devem se apresentar em condições higiênico sanitárias adequadas (OKAZAKI *et al.*, 2014).

Conforme RDC 307 de 14 de novembro de 2002, lactários são espaços que dispõem de área para recepção, lavagem de mamadeiras e outros utensílios, área para desinfecção de alto nível de mamadeiras e área para esterilização terminal (BRASIL, 2002).

O procedimento em um lactário, demonstrado na figura 2.3, consiste no preparo de fórmulas lácteas e não lácteas, seguido do envase em mamadeiras que por sua vez passam pelo processo de esterilização, e seguem para a distribuição (BRASIL, 2002).



Fonte: <https://pt.scribd.com/doc/23753395/Procedimentos-lactario>

Figura 2.3: Procedimento padrão em lactários

2.3 SALMONELLA

O gênero *Salmonella* pertencente à família Enterobacteriaceae caracteriza-se como bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase positivo, oxidase negativo e redutores de nitrato, capazes de multiplicar-se em diversas condições ambientais (GERMANO e GERMANO, 2015).

Este compreende as espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a *S. enterica* composta por 6 subespécies (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*) e mais 2600 sorovares conhecidos (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014)

A *Salmonella* pode se desenvolver em uma faixa de temperatura que varia de 8°C até 47°C, sendo sua temperatura ótima de desenvolvimento em 37°C. Não há multiplicação da maior parte dos sorotipos em temperaturas abaixo de 7°C e a inativação das células ocorre em temperaturas acima de 55°C (SILVA, 2001). Já em relação ao pH, para crescimento das células varia entre 3,8 e 9,5, sendo o pH ótimo entre 7,0 e 7,5 (JAY, 2005).

Embora necessitem de grandes valores de atividades de água para se desenvolverem, cerca de 0,94, estes microrganismos podem sobreviver em alimentos com baixa atividade de água, tais como pimenta do reino e chocolate (GERMANO e GERMANO, 2015).

Bactérias do gênero *Salmonella* são microrganismos que estão amplamente distribuídas na natureza, tendo como reservatório principal o trato intestinal humanos e de outros animais. São tidos como de grande importância para a epidemiológica em Saúde Pública, sendo comumente envolvidas em casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), podendo causar doenças graves, especialmente em crianças, idosos e imunodeprimidos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A presença deste agente em alimentos oferece potenciais riscos à saúde do consumidor. Sendo assim, a legislação brasileira, através da resolução RDC de nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), define como parâmetro de aceitação microbiológica para grande parte dos alimentos, incluindo as fórmulas lácteas infantis, a ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de amostra.

A contaminação de fórmulas nutricionais por este patógeno tem sido apontada como causa de infecções hospitalares, trazendo sequelas severas e morte por septicemia de crianças e recém nascidos (NIENOV *et al.*, 2009).

A veiculação da *Salmonella* pode ocorrer em diversas etapas do preparo nos lactários, sendo as principais fontes o uso de água contaminada para reconstituição, manipulação em condições higiênicas inadequadas e abusos no binômio tempo x temperatura (LINHARES, 2012).

Falhas no processo de preparo nos lactários ou ainda a capacidade de resistência de microrganismos, reforçam a necessidade de conhecimento de melhores condições e métodos alternativos que garantam a qualidade dos alimentos (WU *et al.*, 2002).

A resistência térmica dos microrganismos possivelmente depende de variáveis como a concentração de células no substrato, a presença de outros microrganismos que promovam a competição e as propriedades do ambiente em que estão inseridos (pH, Atividade de água, lipídeos, proteínas, etc.) (JAY, 2005).

Ainda de acordo com Jay, em lácteos a existência de interações entre fração proteica e cátions bivalentes, presentes no soro de leite, provavelmente estão relacionadas com a proteção da *Salmonella* nos processamentos térmicos.

Com o objetivo de avaliar a resistência térmica da *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil em pó reconstituída, em 2006, Rowlands e colaboradores mostraram que tratamentos térmicos realizados em banho maria a 60 e 70°C/5 minutos, não foram suficientes para eliminar toda população dos três sorotipos de *Salmonella* ($10^6 \text{NMP} \cdot \text{mL}^{-1}$), demonstrando que as etapas de preparo e manipulação em lactários consideradas como pontos críticos de controle (ROWLANDS *et al.*, 2006).

Já em estudos com a utilização de micro-ondas, em 2015, Moraes e colaboradores concluíram que quando contaminadas no preparo, as fórmulas submetidas, em pequenas porções, ao tratamento em micro-ondas doméstico por 30 segundos, apresentam melhores resultados na inativação da *Salmonella*, quando comparados aos tratamentos térmicos convencionais em banho maria por 60°C e 70°C por 10 e 5 minutos (MORAES *et al.*, 2015).

2.4 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é um ramo da microbiologia de alimentos que usa modelos matemáticos para descrever curvas de crescimento/inativação de micro-organismos. Os dados são obtidos com estudos experimentais quantitativos. Os dados experimentais são determinados sob condições específicas e buscam descrever os efeitos de fatores intrínsecos (atividade de água, potencial redox, pH) e fatores extrínsecos (temperatura, umidade relativa, atmosfera modificada) sobre os microrganismos nos alimentos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A primeira demonstração do uso de modelos matemáticos foi apresentada por Esty e Meyer em 1922. Os autores descreveram a cinética de inativação de esporos de *Clostridium botulinum* tipo A. Foi utilizado um modelo matemático linear, essa equação descreve a relação linear entre a taxa de inativação dos esporos da bactéria em função do tempo, considerando uma temperatura constante. Ainda é o modelo mais aplicado e difundido na área de processamento térmico (PÉREZ-RODRÍGUEZ & VALERO, 2013).

O grande avanço da microbiologia preditiva foi dado nos anos 80, a partir do desenvolvimento de programas computacionais sofisticados e da popularização dos computadores (LOPEZ-GOMES *et al.*, 2009).

Este repentino interesse pela microbiologia preditiva ocorreu devido ao aumento dos casos de surtos de toxinfecções alimentares, envolvendo patógenos como *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*. Sendo assim, pesquisas desenvolvidas nos Estados Unidos, Reino Unido e outros países da União Europeia foram priorizadas na conscientização da necessidade de produzir alimentos seguros (McMEEKIN *et al.*, 1996; DUARTE, 2011).

Atualmente modelos preditivos auxiliam no planejamento e avaliação de projetos visando a conservação dos alimentos de forma rápida e com menor custo. Com o auxílio dos dados obtidos, pode-se prever de forma confiável parâmetros que descrevam o comportamento microbiano de interesse, como a cinética de crescimento, inativação e/ou sobrevivência aplicada ao alimento (SARMENTO, 2006).

2.4.1 Modelos preditivos

De forma a unificar a Microbiologia, a Engenharia e a Estatística, os modelos matemáticos são descritos sob aspectos mecanísticos e estocásticos e cinéticos. Os modelos estocásticos são modelos usados para prever a probabilidade da ocorrência de um evento, como por exemplo, a germinação de esporos ou a produção de toxina. Os modelos mecanísticos correspondem à modelagem da extensão e velocidade de crescimento de populações ou destruição de microrganismos de interesse (ROSS; McMEEKIN, 1996).

Esses mesmos modelos, mecanísticos e estocásticos também são definidos conforme os seus parâmetros, podendo ser denominados como lineares ou não-lineares, que por sua vez podem ser classificados como: primários, secundários ou terciários (DANNENHAUER, 2010).

Os modelos primários, são geralmente modelos cinéticos, que descrevem a resposta microbiana em função do tempo, em um determinado ambiente específico. Para este caso podem ser citados, a variação do número de UFC/mL ou ainda a formação de uma toxina (DANNENHAUER, 2010).

Os modelos secundários avaliam a influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no comportamento microbiano (tempo de geração, velocidade de multiplicação, taxa de inativação, etc.). Dessa forma, são geradas equações matemáticas que são capazes de prever o comportamento microbiano em função da variação desses fatores (DANNENHAUER, 2010).

Já nos modelos terciários, nestes torna-se possível a resolução dos modelos primários e secundários, através de rotinas de softwares computacionais. Nesta apresentação é permitido o cálculo das mudanças nas condições, a comparação do comportamento de um ou mais microrganismos, sob diferentes condições ou ainda, construir curvas de crescimento microbiano (WHITING, 1995).

Sant'ana em 2011, desenvolveu modelos primários e secundários capazes de descrever o desenvolvimento de *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes* em verduras minimamente processadas. Seu trabalho avaliou a taxa de multiplicação dos patógenos em função de diferentes temperaturas de armazenamento, obtendo modelos precisos à modelagem (SANT'ANA, 2011).

Devido ao avanço na obtenção de informações e a grande quantidade de modelo gerados, torna cada vez mais necessária a utilização de softwares computacionais para que os dados obtidos sejam tratados de forma adequada.

Sendo assim, é possível que sejam modeladas curvas que descrevam o comportamento microbiano sob diferentes condições ambientais (PELEG, 2006).

Para tal, inúmeros softwares e suplementos (*add-in*) encontram-se disponíveis para uso em microbiologia preditiva. Em destaque dois suplementos para Microsoft Excel. O DMFit, que apresenta os modelos mais comuns para cinética de multiplicação. E o GlnaFit, mais utilizado para modelos de inativação, uma ferramenta para auxiliar a indústria de alimentos a executar a modelagem de forma mais simples (GEERAERD, 2005).

2.5 TECNOLOGIAS EMERGENTES

No início de século XIX o desenvolvimento do método de apertização por Nicolás Appert, marcou o avanço na tecnologia de conservação de alimentos. O procedimento consistia em submeter alimentos envasados em recipientes de vidro fechados a aplicação de calor. Com isso, esses alimentos poderiam ser utilizados por tropas militares por longos períodos de tempos mantendo-se preservados (MOLINA *et al.*, 2001; GAVA, 2008).

Com o aperfeiçoamento da técnica, notou-se que apesar de promover a conservação dos alimentos através da inativação dos microrganismos, alterações negativas também ocorriam. A composição dos alimentos alterava-se devido a aplicação do calor, ocorrendo perdas sensoriais (sabor, textura, cor) e perdas nutricionais (perdas de substanciais como as vitaminas) (GAVA, 2008).

Segundo MOLINA *et al.*, já no início do século XX começaram a surgir as tecnologias de conservação de alimentos alternativas, que não utilizavam tratamento térmico ou que este fosse aplicado de forma mais branda, tais como a pasteurização.

Atualmente a busca por alimentos seguros e de alta qualidade tem estimulado o crescente desenvolvimento de novas tecnologias capazes de causar o mínimo de alterações sensoriais e nutricionais (COSTA *et al.*, 1999).

De acordo com VEGA-MERCADO *et al.*, os processamentos não térmicos são vantajosos pois utilizam baixa quantidade de energia quando comparados aos processamentos térmicos, retêm nutrientes e sabor, mantendo os alimentos com frescor. Ao mesmo tempo que garantem a eliminação de microrganismos e esporos e inativa enzimas (VEGA-MERCADO *et al.*, 1997).

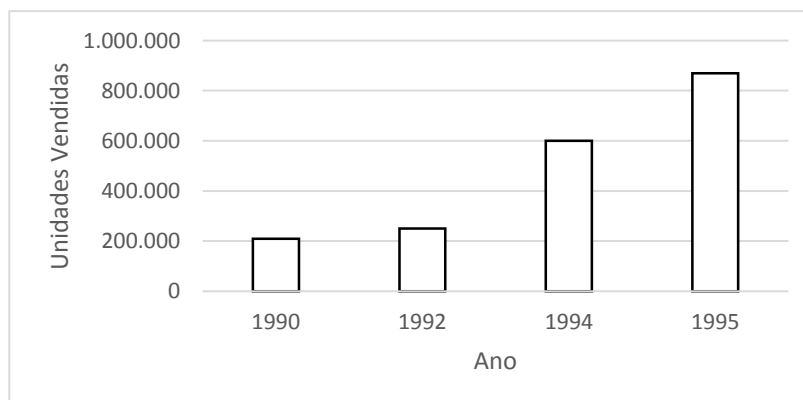
Das tecnologias emergentes mais estudadas e utilizadas em alimentos, considerando resultados de várias pesquisas, as mais significativas para os próximos anos serão: processamento por alta pressão, aquecimento em micro-ondas, luz ultravioleta, irradiação e campo elétrico pulsado (SOARES, 2016).

Silva e colaboradores em 2014 observaram a utilização da radiação gama (0,75; 1,5 e 3,0 kGy) para conservação polpa de amora-preta, concluindo que processo aumentou o shelf life da polpa em 60 dias e o tratamento com uma dose de 1,5 kGy foi a que proporcionou melhor qualidade microbiológica (SILVA *et al.*, 2014).

Um tratamento inovador utilizando a radiação UV foi proposto por Bartnicki, para controle de conídios (*C. perennans*) associados à água de lavagem das maçãs. Os resultados do estudo indicaram que o uso da irradiação foi eficiente no controle dos conídios presentes na superfície das maçãs, obtendo de 94 a 98% de controle em relação às amostras não irradiadas (BARTNICKI, 2010).

2.6 MICRO-ONDAS

O forno de micro-ondas tornou-se utensílio doméstico de grande comercialização no ano de 1967, podendo ser encontrado em mais de 90% das residências norte americanas. No Brasil, o produto tornou-se evidencia nos anos 90, conforme pode ser observado na figura 2.4.



Fonte: GERMANO, 2010

Figura 2.4: Unidades de forno micro-ondas vendidos nos anos 90

Como resposta a esta crescente aquisição e das modificações no estilo de vida e preferências dos consumidores, a indústria de alimentos foi impulsionada a desenvolver produtos que fossem passíveis de serem preparados nos micro-ondas (GERMANO, 2010).

As micro-ondas são caracterizadas por possuírem comprimentos de onda em uma faixa entre 3 e 300 mm. Utilizadas para aquecer os alimentos podem ser denominadas como ondas eletromagnéticas, de frequência vibratória alta (2450 MHz). Geradas através de magnétons, componentes responsáveis por converter energia elétrica em campos magnéticos, as ondas produzidas, penetram no alimento e interagem com os dipolos elétricos das moléculas de água (GERMANO, 2010).

O campo eletromagnético gerado possui centros de cargas positivas e negativas, que através de força de atração e repulsão interagem com as moléculas de água existentes no alimentos, promovendo sua rotação. Com o rompimento das pontes de hidrogênio das moléculas de água e o aquecimento, o calor gerado pela fricção molecular é transferido por convecção através de todas as partes do alimento (GERMANO, 2010).

Devido a propriedade de promover aquecimento nos alimentos, as micro-ondas têm sido utilizadas em diversas aplicações na área de processamento, tais como: secagem, pasteurização, esterilização, descongelamento, têmpera, dentre outras (GUPTA & WONG, 2007).

2.6.1 Inativação por micro-ondas

A inativação por micro-ondas baseia-se na geração de ondas eletromagnéticas que estão reguladas em determinadas frequências passíveis de serem absorvidas por materiais polares. Essas ondas eletromagnéticas atingem a superfície de um dado material, penetrando em seu interior e devido ao atrito intermolecular, há a geração de calor que se propaga por condução. Com isso a presença de água é indispensável para que haja aquecimento por microondas devido à interação das ondas eletromagnéticas com o dipolo elétrico da molécula (BARBOZA *et al.*, 2001).

As micro-ondas possuem uma grande capacidade de penetração e rápida velocidade de aquecimento, garantindo que o processo seja vantajoso quando comparado a outros tipos de radiação. Desta forma, o aquecimento propagado pelo grande número de colisões intermoleculares pode causar desnaturação proteica e dos ácidos nucleicos, causando danos às células. Além disso, a desnaturação das moléculas de DNA é maior quando realizada por meio de micro-ondas do que por outra fonte térmica. Embora esta seja apenas a hipótese mais difundida, pois ainda não se descreve com clareza a real ação das micro-ondas sobre os microrganismos (STROOP *et al.*, 1898; WU, 2008).

Outra hipótese da ação sobre os microrganismos baseia-se na ressonância com o micro-ondas, de outras moléculas eletricamente carregadas presentes nas células, tais como os fosfolípidos. Sendo assim, a vibração destas moléculas poderiam causar lise ou danos a estruturas celulares (CARROLL E LOPEZ, 1969; WU, 2008)

Woo *et al.*, em 2000, avaliaram a morfologia celular de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* submetidas a radiação de micro-ondas a 600W de potência. Os autores constataram a redução na quantidade de células viáveis sem mudança na densidade da suspensão celular após a exposição às micro-ondas. Isso foi atribuído a possibilidade das células não terem sido completamente lisadas, mesmo após terem sido inativadas pela irradiação.

Após análise por microscopia eletrônica de transmissão das células expostas, foi possível observar manchas escuras no citoplasma, que foram atribuídas a possíveis aglomerados de proteínas desnaturadas.

Valero e colaboradores com o objetivo de modelar a inativação de *Salmonella enterica* sorotipo *Enteritidis* em omelete pasteurizado, submeteu o alimento a 300 W, 450 W, 600 W e 800 W. Os resultados não foram significativos para os processamentos nos 30 primeiros segundos em 300 W e 450 W, apresentando reduções de log inferior a 0,5 log UFC g⁻¹. Porém, com a aplicação do processamento de 40 s, as reduções de log se estendem para 4,8 log UFC g⁻¹ em 800 W. As taxas de inativação obtidas a 600 W e 800 W foram 0,67 e 0,63 s⁻¹. Após avaliação dos parâmetros dependentes da temperatura pelo modelo Weibull, concluiu-se que os binômios, 300 W-80 s; 450 W-60 s ou 600 W / W-800 40 s, asseguraram uma temperatura igual ou superior a 70 ° C alcançando uma redução mínima de 4 log da população de *Salmonella*. Os resultados obtidos estavam em conformidade para estabelecimentos de serviços de alimentação, sendo então o método considerado eficaz no tratamento das omeletes (VALERO, 2014).

Na tentativa de desenvolver uma forma eficaz de inativar o *Trypanosoma cruzi* em leite materno, Ferreira e colaboradores submeteram amostras de leite humano contaminadas com *T. cruzi* a aquecimento em aparelho de micro-ondas doméstico. As amostras foram expostas durante 7 minutos a 45% da capacidade de potência do micro-ondas, atingindo 63 °C. Após inoculação via oral em animais, foram realizados exames microscópicos e sorológicos e nenhum resultado positivo para contaminação foi detectado, demonstrando a eficácia do processo (FERREIRA *et al.*, 2003).

Outro estudo objetivou comparar o processo de pasteurização clássica ao utilizando as micro-ondas. Para isso em 2007, Souza realizou três processamentos distintos em amostras de leite. Em cada processamento, as amostras foram pasteurizadas (72-75°C/15-20s) em trocador de calor de placas e em de micro-ondas de forma simultânea. Em seguida foram refrigeradas, envasadas e armazenadas em câmara refrigerada (4±1°C).

Os resultados mostraram que a pasteurização por micro-ondas foi mais eficiente, apresentando-se microbiologicamente dentro dos padrões estabelecidos em legislação e com uma vida de prateleira de 14 dias, enquanto na pasteurização clássica as amostras atingiram 11 dias (SOUSA, 2007).

2.7 MICROBIOLOGIA PREDITIVA, MICRO-ONDAS E FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS

Assim como qualquer alimento, as fórmulas lácteas infantis estão sujeitas a contaminação, seja no preparo, em falhas na esterilização ou ainda na distribuição das mamadeiras nos lactários (MEZOMO, 1987; LINHARES, 2012).

A utilização de tecnologias alternativas não-térmicas tem sido relatada como um método viável para redução da microbiota em alimentos, assegurando qualidade e prolongando a vida de prateleira (AYMERICH *et al.*, 2008). Juntamente com a microbiologia preditiva, os softwares computacionais, atuam prevendo o comportamento de micro-organismos presentes nos alimentos. (ALISSON, 2013).

Em estudo para avaliação da aplicação do tratamento por ultrassom em fórmulas lácteas infantis reconstituídas, Adekunte e colaboradores submeteram seus dados a modelagem preditiva, avaliando a dependência da inativação de *Cronobacter sakazakii* com a temperatura e o ultrassom. Como conclusão, foi observado que o ultrassom combinado com a temperatura foi eficiente para reduzir significativamente os níveis microbianos de *Cronobacter sakazakii*.

Outra tecnologia emergente facilmente aplicável em lactários é a de micro-ondas. Há poucos relatos a respeito da eficácia desse processamento na inativação de patógenos, principalmente relacionado à *Salmonella*. Este estudo tem por objetivo avaliar a eficiência do tratamento por micro-ondas na inativação desse patógeno, utilizando ferramentas de microbiologia preditiva. É importante ressaltar que este é um trabalho pioneiro e que pode contribuir imensamente para a melhoria da segurança microbiológica das preparações a base de formulas infantis.

3 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde recomenda que os bebês recebam exclusivamente o leite materno durante os primeiros seis meses de idade, porém situações nas quais há riscos para a saúde do lactente, a amamentação natural não é recomendada (OPAS, 2007). Para dadas situações, a utilização de fórmulas lácteas infantis torna-se a melhor alternativa, uma vez que, suprirão as necessidades nutricionais dos lactentes, sem comprometer seu crescimento e desenvolvimento.

A imaturidade imunológica dos neonatos torna-os extremamente passíveis a aquisição de infecção hospitalar (MUSSI-PINHATA & REGO, 2005). Infecções adquiridas através da administração de fórmulas nutricionais, principalmente em imunodeprimidos, tem se tornado frequente no cotidiano hospitalar (SANTOS *et al.*, 2004; ACCIOLY *et al.*, 2009).

Os principais agentes citados como contaminantes deste tipo de alimento, incluem em destaque o grupo de coliformes e bacilos gram-negativos, tais como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp, *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp. E *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) (ROSSI *et al.*, 2010).

Diante desse panorama salienta-se a necessidade de melhorias no preparo e administração destas formulações. Através da microbiologia preditiva torna-se possível a predição do comportamento de microrganismos, facilitando a busca pela segurança alimentar.

As tecnologias emergentes surgem na tentativa de obter alimentos processados seguros e com melhores qualidades nutricionais. Os aparelhos de micro-ondas são equipamentos de fácil manuseio em lactários podendo ser utilizados como alternativa ao tradicional tratamento com banho-maria.

O desenvolvimento de um modelo matemático aplicado a segurança microbiológica de fórmula lácteas infantis com a utilização de micro-ondas, ainda não é um tema explorado. Sendo assim, sabendo-se que a *Salmonella* constitui um patógeno de importância nos casos envolvendo contaminações em lactários, sugere-se nesse trabalho o desenvolvimento de modelos preditivos capazes de descrever a inativação deste microrganismo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Aplicação de modelos preditivos para descrever a curva de inativação de *Salmonella* em fórmulas lácteas infantis utilizando tratamento por micro-ondas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do uso do micro-ondas como alternativa ao método tradicional utilizado no processamento de fórmulas lácteas infantis.
- Determinar os parâmetros de inativação da *Salmonella* em diferentes potências de tratamento por micro-ondas
- Desenvolver o modelo preditivo secundário em função da variação da potência do tratamento por micro-ondas
- Validar a metodologia para o tratamento em micro-ondas, testando diferentes cepas de *Salmonella*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ESTIRPES UTILIZADAS NESTE TRABALHO

As estirpes utilizadas neste trabalho encontram-se descritas na tabela 5.1. Essas culturas foram mantidas estocadas em caldo Casoy (Himedia) com 40 % (p/v) de glicerol a -20°C.

Tabela 5.1: Estirpes de Referência.

Estirpe	Origem e Identificação	Utilização
<i>Salmonella enterica</i> subs. enterica, sorotipo Typhi	ATCC19214*	Estudos de inativação em fórmula láctea infantil em micro-ondas.
<i>Salmonella enterica</i> subs. enterica, sorotipo Enteritidis	S064**	Estudos de Validação
<i>Salmonella enterica</i> subs. enterica, sorotipo Agona	IOC1772/11**	Estudos de Validação
<i>Salmonella enterica</i> subs. enterica, sorotipo Anatum	S156**	Estudos de Validação
<i>Salmonella enterica</i> subs. enterica, sorotipo Senftenberg	S087**	Estudos de Validação

Fonte: *ATCC, American Type Culture Collection; LMIFRJ.

**Coleção de Cepas Fiocruz.

5.1.1 Preparo dos inóculos

As cepas foram reativadas em ágar Casoy por incubação a 37°C durante 18-24 h. Após, os inóculos puderam ser preparados com água peptonada 0,1% estéril em tubos, a partir da escala de Mc Farland 0,5 para que se obtivesse uma concentração aproximada de 10^8 UFC*mL⁻¹

Como controle durante todo o experimento, inoculou-se placas de petri com os preparados da escala de Mc Farland contidos nos tubos, para que se tivesse o real quantitativo de células.

5.2 FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS

As fórmulas utilizadas encontravam-se sob a forma desidratada e foram adquiridas em farmácias locais. A marca comercial utilizada foi a Aptamil 2 (Danone®), pois representa uma formulação comumente utilizada no cotidiano de lactários.

5.2.1 Preparo das fórmulas infantis

Em todas as etapas dos experimentos, as fórmulas foram preparadas segundo orientação do fabricante, utilizando água destilada estéril.

Alíquotas das amostras preparadas (Branco), foram inoculadas ao longo de todo trabalho para um melhor controle do experimento, garantindo que apenas células de *Salmonella* estivessem sendo inoculadas e expostas ao micro-ondas. Dispensando, assim, a utilização de um meio de cultura seletivo/diferencial.

5.3. CONDIÇÕES DE AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA* EM MICRO-ONDAS

A fórmula foi reidratada com água estéril conforme orientações do fabricante, distribuída em porções de 15 mL em tubos falcon comercialmente estéreis. As condições de utilização são apresentadas na tabela 5.2.

TABELA 5.2: Potências e tempos utilizados nos experimentos.

Potências de micro-ondas em Watt(W)	Tempos de exposição em segundos(s)
20	0, 15, 25, 30, 45, 60, 65, 70, 90, 120, 180, 270, 360, 450, 600, 750.
40	0, 15, 25, 30, 45, 60, 65, 70, 90, 120, 180, 270, 360.
60	0, 15, 25, 30, 45, 60, 65, 70, 90, 120.
80	0, 15, 25, 30, 45, 60, 65, 70, 90, 120.

Cada amostra representada por um tubo falcon contendo 15 mL de leite foi inoculada com 1,5 mL do inóculo previamente preparado, com a estirpe de interesse. Desta forma obteve-se uma concentração inicial de inóculo aproximada de 10^7 UFC/mL.

A exposição das amostras as micro-ondas foi realizada em um aparelho de micro-ondas doméstico (marca Eletrolux, modelo 10311LBA106, tensão 127 V, potência 1000 W).

Conforme a amostra era preparada e exposta a um binômio tempo (s) vs. potência (W) especificados, imediatamente após a exposição, a temperatura final da amostra era medida através de termômetro infravermelho (marca Icoterm, modelo ST-600.00) e a quantificação microbiana realizada.

5.4 QUANTIFICAÇÃO E SALMONELLA

Após serem inoculadas, as amostras eram vigorosamente agitadas e submetidas as micro-ondas. A análise microbiológica foi realizada pelo método de plaqueamento por *spread plate* em ágar casoy, todas em duplicatas. As diluições seriadas foram realizadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% de acordo com a necessidade de cada potência e tempo utilizados.

Além de duplicatas, para cada potência, o experimento foi realizado em duas repetições.

A quantificação pôde ser feita após 18-24 h de incubação a 37°C; as duplicatas foram consideradas em todas as médias calculadas nos experimentos.

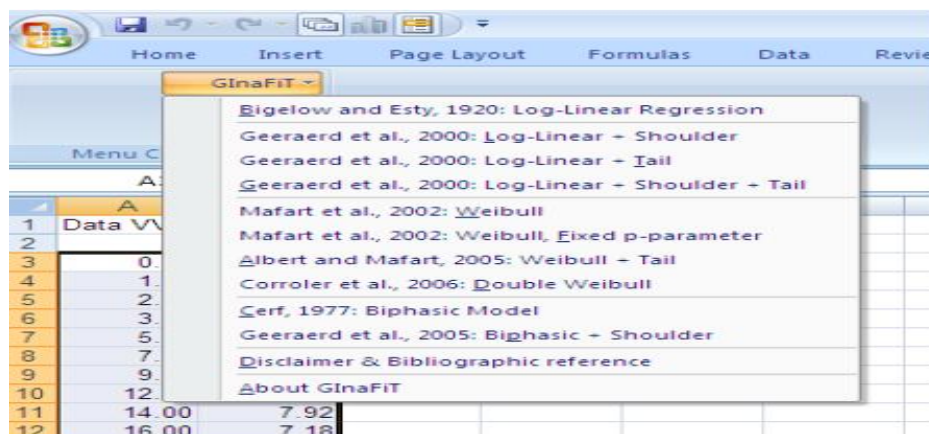
Os dados foram submetidos a análise estatística de Anova e teste de Tukey.

5.5 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS PREDITIVOS E VALIDAÇÃO

5.5.1 Determinação dos parâmetros de inativação de *Salmonella* em formulas infantis

Os procedimentos de preparo e inoculação das amostras foram baseados no procedimento descrito por Al-Holy e colaboradores, com a finalidade de reproduzir o procedimento realizados em lactários. As potências foram estabelecidas baseando-se nas condições passíveis de aplicações em hospitais e que não promovessem a deterioração aparente nas fórmulas infantis (AL-HOLY, 2009).

Os pontos para as curvas de inativação, em cada potência, foram coletados conforme a tabela 5.2. Para a determinação dos parâmetros de inativação, foi plotado o logaritmo da população *versus* tempo. Para o ajuste dos modelos de inativação foi utilizado o suplemento GlnaFit (GEERAERD *et al.*, 2005). Foram testados os modelos disponíveis no suplemento (Figura 5.1). As equações testadas e disponíveis no suplemento estão apresentadas na tabela 5.3



Fonte: Manual GlnaFIT (2012).

Figura 5.1: Modelos matemático GlnaFIT.

Tabela 5.3: Modelos e equações disponíveis no GlnaFiT.

Modelo	Equação
Bigelow and Easty, 1920: Log-linear Regression	$\log_{10}(N) = \log_{10}(N(0)) - \frac{t}{D}$
Geeraerd et al., 2000: Log-Linear + Shoulder	
Geeraerd et al., 2000: Log-Linear + Tail	$\log_{10}(N) = \log_{10}[(10^{\log_{10}(N(0))} - 10^{\log_{10}(N_{res})}) \cdot e^{-k_{máx} t} + 10^{\log_{10}(N_{res})}]$
Geeraerd et al., 2000: Log-Linear + Shoulder + Tail	$\log_{10}(N) = \log_{10}[(10^{\log_{10}(N(0))} - 10^{\log_{10}(N_{res})}) \cdot e^{-k_{máx} t} \cdot \left(\frac{e^{k_{máx} S_1}}{1 + (e^{k_{máx} S_1} - 1) \cdot e^{-k_{máx} t}} \right) + 10^{\log_{10}(N_{res})}]$
Mafart et al., 2002: Weibull	
Mafart et al., 2002: Weibull, Fixed p-parameter	$\log_{10}(N) = \log_{10}[(N(0) - N_{res}) \cdot 10^{-(\frac{t}{\delta})^p} + N_{res}]$
Albert and Mafart, 2003: Weibull + Tail	
Cerf, 1977: Biphasic Model	$\log_{10}(N) = \log_{10}(N(0)) + \log_{10}(f \cdot e^{-k_{máx1} t} + (1 - f) \cdot e^{-k_{máx2} t}) \cdot \frac{e^{k_{máx1} S_1}}{1 + (e^{k_{máx1} S_1} - 1) \cdot e^{-k_{máx1} t}}$

Onde: N é concentração de célula microbiana (UFC/mL), N(0) é a concentração inicial de células microbianas (UFC/mL), N_{res} é a concentração residual de células microbianas (UFC/mL), K_{máx} é a taxa de inativação (1/unidade de tempo), t é o tempo do tratamento (unidade de tempo), D é o tempo de redução decimal (unidade de tempo), S é o parâmetro de representação do ombro (unidade de tempo), δ é o tempo para a primeira redução decimal (unidade de tempo) e p é a fração da população inicial na maior subpopulação.

O ajuste dos modelos foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R²) e erro médio quadrado (MSE). O R² é o coeficiente de correlação dos dados, quanto mais próximo de 1, melhor o modelo é ajustado. O MSE é o erro quadrático médio, que representa os resíduos existentes entre os valores preditos e observados e quanto mais próximo de zero, melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

Na modelagem primária, foi determinado o valor referente ao 4D, ou seja, o tempo necessário para causar 4 reduções decimais na população de *Salmonella*.

A determinação desse parâmetro é indicativo de segurança, aplicada ao alimento, recomendado por agências regulatórias.

5.5.2 Modelagem secundária

Para o modelo secundário foi ajustada a equação da raiz quadrada, proposta por Ratkowsky (1983). Foi correlacionada a taxa de inativação com a potência, conforme apresentado na equação 5.1

Para a ANOVA foi utilizado o software XLSTAT 2015.5.01.22595 (Statistical software & data analysis add-on for Excel, 2015).

$$\sqrt{k_{max}} = b (P - P_{min}) \quad (5.1)$$

Onde: k_{max} = taxa de inativação; P = Potência

5.5.3 Validação do Modelo Secundário

Para a validação biológica do modelo secundário foram utilizados 4 diferentes sorotipos de *Salmonella* e valores intermediários de potência (30W e 50W).

Validação matemática do modelo foram calculados os fatores de Bias e Exatidão, o coeficiente de correlação (R^2), o erro quadrático médio (MSE). As equações estão apresentadas na tabela 5.4.

Tabela 5.4: Equações dos para validação matemática do modelo

Parâmetro	Equação
Coeficiente de correlação (R^2)	$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\text{predito} - \text{observado})^2}{\sum_{i=1}^n (\text{observado} - \text{média})^2}$
Erro quadrático médio (MSE)	$MSE = \frac{\sum (\text{predito} - \text{observado})^2}{n - p}$
Fator bias	$\text{bias} = 10^{\frac{\sum \log(\text{predito}/\text{observado})}{n}}$
Exatidão	$\text{Exatidão} = 10^{\frac{\sum \log(\frac{\text{predito}}{\text{observado}}) }{n}}$

Onde: Predito: valor obtido através do uso do modelo.

Observado: valor obtido experimentalmente.

(n-p): número de graus de liberdade.

n: número de amostras.

p: número de parâmetros estimados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 QUANTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA

As contagens de células viáveis durante os tratamentos para inativação da *S. Typhi* estão expressas na tabela 6.1. Os tratamentos a 20W (750s), 40W (90s), 60W (120s) e 80W (120s), tiveram reduções de 9,22; 9,59; 8,23 e 8,57 log UFC* mL⁻¹ respectivamente.

Para a potência de 20W observou-se que o tratamento ocorreu a longo prazo, uma vez que as amostras resistiram até 750 s sem degradação aparente. Nesta potência, um efeito mais significativo sobre a quantificação foi observado a partir do tempo de 180s reduzindo 3,72 log UFC*ml⁻¹ da concentração inicial de células.

A partir de 180 s a 40W, já pôde ser observada a ausência de quantificação para o método utilizado. A inativação do patógeno ocorreu inicialmente de forma mais lenta e a partir de 60s de exposição para esta mesma potência obteve-se uma menor resistência da *Salmonella* as micro-ondas, a partir da redução de 6,05 log UFC*mL⁻¹.

A 60W, a inativação ocorreu de forma gradual ao longo do tempo de exposição máximo de 120s. De outra forma, para a potência de 80W, a exposição as micro-ondas, demonstrou maior diferenciação em tempos menores a partir de 25s, com inativação de 3,41 log UFC*ml⁻¹.

Em estudo similar utilizando a exposição de fórmulas lácteas infantis as micro-ondas, Kindle e colaboradores inocularam 10⁵ UFC*mL⁻¹ de uma suspensão de microrganismos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonie*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candia albicans*, *Enterobacter sakazakii* e *Mycobacterium*) em cinco diferentes tipos de fórmulas reconstituídas. E após o tratamento, observaram uma diminuição significativa na população microbiana, concluindo assim que este tipo de método é eficiente a ser utilizado (KINDLE *et al.*, 1996).

Outra pesquisa investigou a eficácia de micro-ondas para a inativação de *Cronobacter sakazakii* em fórmula infantil em pó reconstituído. Utilizando potências na faixa de 400-900 W e tempos de exposição variando de 0 a 120s. Como resultados, obteve-se uma redução da população inicial de *C. sakazakii* para níveis indetectáveis (≥ 8 ciclos log), em potências entre 800-900 W (PINA-PÉREZ, 2014).

Tabela 6.1: Quantificação microbiana de *Salmonella typhi* nas amostras de fórmula láctea infantil.

Quantificação de <i>S. Typhi</i> (Log UFC*mL ⁻¹)								
Potência (W)	Controle (0 s)	15 s	25 s	30 s	45 s	60 s	65 s	70 s
20	10,50 ^a ± 0,07	10,43 ^a ± 0,01	10,35 ^a ± 0,02	10,25 ^a ± 0,02	10,22 ^a ± 0,005	10,18 ^a ± 0,005	10,1 ^a ± 0,07	9,91 ^a ± 0,14
40	10,28 ^a ± 0,125	9,96 ^a ± 0,00	9,86 ^a ± 0,03	7,62 ^b ± 0,08	7,15 ^b ± 0,56	5,67 ^b ± 0,10	3,59 ^b ± 0,28	1,89 ^b ± 0,02
60	9,34 ^b ± 0,055	7,70 ^b ± 0,12	6,75 ^b ± 0,05	5,62 ^c ± 0,03	5,04 ^c ± 0,61	3,29 ^c ± 0,145	3,10 ^b ± 0,05	2,85 ^b ± 0,07
80	9,04 ^b ± 0,035	6,55 ^b ± 0,21	5,63 ^c ± 0,20	3,32 ^d ± 0,26	2,91 ^c ± 0,67	1,24 ^d ± 0,045	1,06 ^c ± 0,02	0,71 ^c ± 0,06

Quantificação de <i>S. Typhi</i> (Log UFC*mL ⁻¹)								
Potência (W)	90 s	120s	180 s	270 s	360 s	450 s	600 s	750 s
20	9,36 ^a ± 0,02	-**	6,78 ± 0,17	6,22 ± 0,07	4,50 ± 0,15	3,42 ± 0,04	2,09 ± 0,09	1,28 ± 0,10
40	0,69 ^c ± 0,13	-	< 2	< 2	-	-	-	-
60	1,26 ^b ± 0,03	1,11 ^a ± 0,05	-	-	-	-	-	-
80	0,47 ^c ± 0,03	0,26 ^b ± 0,03	-	-	-	-	-	-

*Análises efetuadas em duplicatas. Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística de acordo com o Tukey test (p<0.05). Foi observado efeito significativo do tempo (p<0.05).

**Para esses binômios (Potência versus Temperatura), a quantificação não foi possível, pois as amostras foram degradadas após a exposição.

6.2 TEMPERATURAS DURANTE OS TRATAMENTOS

Os tratamentos realizados no micro-ondas resultaram no aquecimento das amostras, devido ao grande número de colisões intermoleculares das moléculas de água presentes no alimento. Essas temperaturas foram averiguadas ao fim de cada binômio tempo/ potência conforme pode ser observado na tabela 6.2.

As amostras suportaram aproximadamente 110 °C sem deterioração aparente. Para as amostras a 20, 40, 60 e 80 W, as variações de temperatura foram 64,4; 79,6; 80,2 e 83,6 °C respectivamente.

No gráfico 6.1 é possível observar que o tratamento a 20 W destacou-se dos demais, com aumentos de temperaturas, menos significativos ao longo de um intervalo de tempo maior. Os demais tratamentos de 40, 60 e 80 W, apresentaram perfis de variação de temperaturas semelhantes.

De acordo com Pina-Pérez e colaboradores para avaliação dos efeitos das micro-ondas em fórmulas lácteas infantis contaminadas com *Cronobacter sakazakii*, foram observadas temperaturas máximas de $78,8 \pm 2,3$ °C e $88,1 \pm 1,5$ °C, para tratamentos utilizando 800-900 W por 120 s (PINA-PÉREZ, 2014).

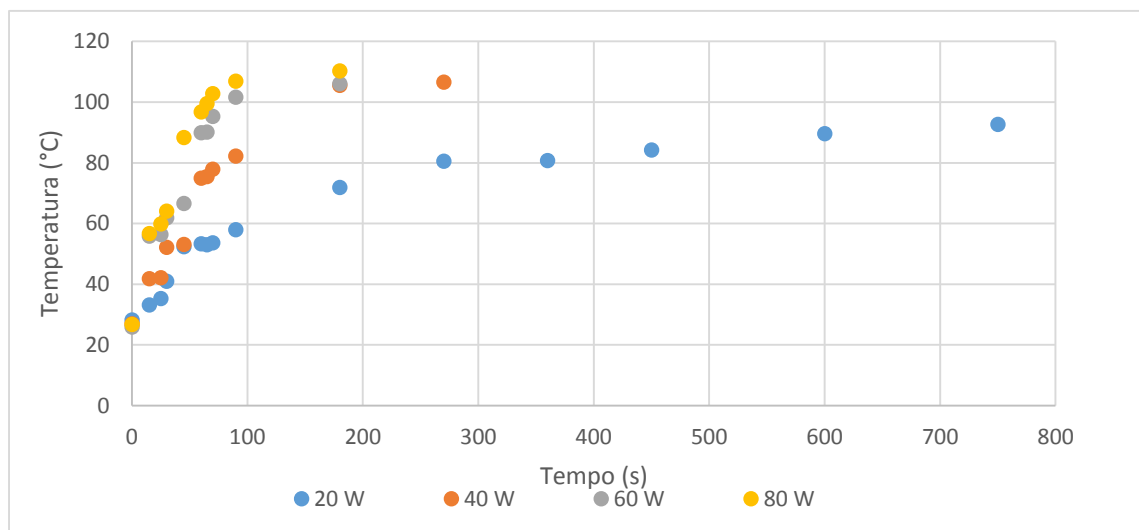


Gráfico 6.1: Perfil de variação de temperaturas ao longo do tempo.

Tabela 6.2: Temperaturas das amostras de fórmula láctea infantil submetidas aos tratamentos em micro-ondas.

Temperaturas das amostras (°C)								
Potência (W)	Controle (0 s)	15 s	25 s	30 s	45 s	60 s	65 s	70 s
20	28,2 ± 0,70	33,1 ± 0,20	35,2 ± 0,10	40,9 ± 0,05	52,3 ± 0,00	53,2 ± 0,25	53,0 ± 0,80	53,6 ± 0,15
40	26,9 ± 0,90	41,8 ± 0,15	42,1 ± 0,60	52,1 ± 0,05	53,0 ± 0,05	74,9 ± 0,70	75,4 ± 0,70	77,8 ± 0,05
60	25,8 ± 0,25	55,8 ± 0,20	56,3 ± 0,40	61,8 ± 0,80	66,6 ± 0,10	89,8 ± 0,15	90,1 ± 0,10	95,2 ± 0,25
80	26,6 ± 0,15	56,6 ± 0,30	59,8 ± 0,20	64,0 ± 0,10	88,3 ± 0,20	96,7 ± 0,25	99,5 ± 0,50	102,7 ± 0,10

Temperaturas das amostras (°C)								
Potência (W)	90 s	120s	180 s	270 s	360 s	450 s	600 s	750 s
20	57,9 ± 0,00	-*	71,8 ± 0,20	80,5 ± 0,50	80,7 ± 0,70	84,1 ± 0,15	89,5 ± 0,50	92,6 ± 0,60
40	82,1 ± 0,35	-	105,5 ± 0,10	106,5 ± 0,45	-	-	-	-
60	101,6 ± 0,40	106,0 ± 0,10	-	-	-	-	-	-
80	106,9 ± 0,10	110,2 ± 0,20	-	-	-	-	-	-

*Essas temperaturas, não foram possíveis de serem avaliadas, pois as amostras foram degradadas após a exposição.

6.3 AJUSTES AOS MODELOS DE INATIVAÇÃO PRIMÁRIOS

Os modelos que apresentaram melhor ajuste estão descritos na tabela 6.3. Para a seleção dos modelos foi considerado coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,97 e Erro quadrático médio menor que 0,3.

Em potências mais baixas, 20 e 40 W, os dados geraram modelos que apresentam o formato de ombro, permitindo avaliar que a população bacteriana mostrou certa resistência as micro-ondas. Para a potência de 20 W, foi apresentado um valor de 4 D de 228,75 s, o que salienta a apresentação do modelo de ombro e da resistência do patógeno ao tratamento. Isto é representado de forma clara no gráfico 6.2, no qual para esta potência, a curva de inativação apresentou um decaimento muito mais lento, quando comparado aos demais tratamentos.

Na potência de 20 W, o melhor ajuste apresentou formato bifásico, apresentando duas taxas de inativação distintas, $k_{máx1}$ e $k_{máx2}$. Isto caracteriza a presença de duas subpopulações com diferentes resistências ao tratamento. Observando o modelo bifásico, descrito na Tabela 3, observa-se que a primeira subpopulação, menos resistente, possui um índice de mortandade maior, caracterizado pelo $K_{máx 1}$, onde f representa esta fração populacional. E a segunda subpopulação, de fração $(1 - f)$ e caracterizada pelo menor índice $K_{máx 2}$, por sua vez mais resistente ao tratamento.

Já na potência de 40 W, apresentou-se um modelo com ombro, porém com uma resistência do microrganismo menor, quando comparada ao tratamento de 20 W. Observou-se valores de 4D de 50,4 s, um quarto do valor médio da potência menor. No Gráfico 2 é possível observar o comportamento da população de *salmonella* testado, onde para 40W, a resistência é representada pelo ombro inicial da curva, logo após a dinâmica de inativação torna-se semelhante as maiores potências, com valores de $K_{máx}$ e 4D mais comparáveis as dinâmicas de 60 e 80 W.

Nos tratamentos com potências de 60 e 80W, observou-se a apresentação do modelo log linear como o melhor ajuste. Este é o modelo mais clássico encontrado nas dinâmicas de inativação de bactérias em sistemas simples (BEVILACQUA *et al.*, 2015).

Tabela 6.3: Melhores ajustes aos modelos do GlnaFIT.

Potência (W)	Modelos	Parâmetros		Tempo 4D (s)	R ²	MSE
20	Geeraerd <i>et al.</i> 2005, : Biphasic+ Shoulder	f	0,9997 ± 0,0002	228,75 ± 11,25	0,9925 ± 0,001	0,1186 ± 0,016
		Kmáx 1	0,045 ± 0,005			
		Kmáx 2	0,015 ± 0,005			
		Log10(N0)	10,71 ± 0,090			
40	Geeraerd <i>et al.</i> ,2000 :Log- Linear + Shoulder	Kmáx	0,33 ± 0,01	50,4 ± 1,80	0,9860 ± 0,002	0,3598 ± 0,047
		Log10(N0)	10,17 ± 0,045			
		SI((should erlength)	21,92 ± 0,86			
60	Bigelow and East, 1920: LogLinear Regressio	Kmáx	0,21 ± 0,00	45,0 ± 0,00	0,9904 ± 0,002	0,0860 ± 0,017
		Log10(N0)	9,05 ± 0,075			
80	Bigelow and East, 1920: LogLinear Regressio	Kmáx	0,28 ± 0,005	32,15 ± 0,35	0,9794 ± 0,002	0,2738 ± 0,023
		Log10(N0)	8,67 ± 0,150			

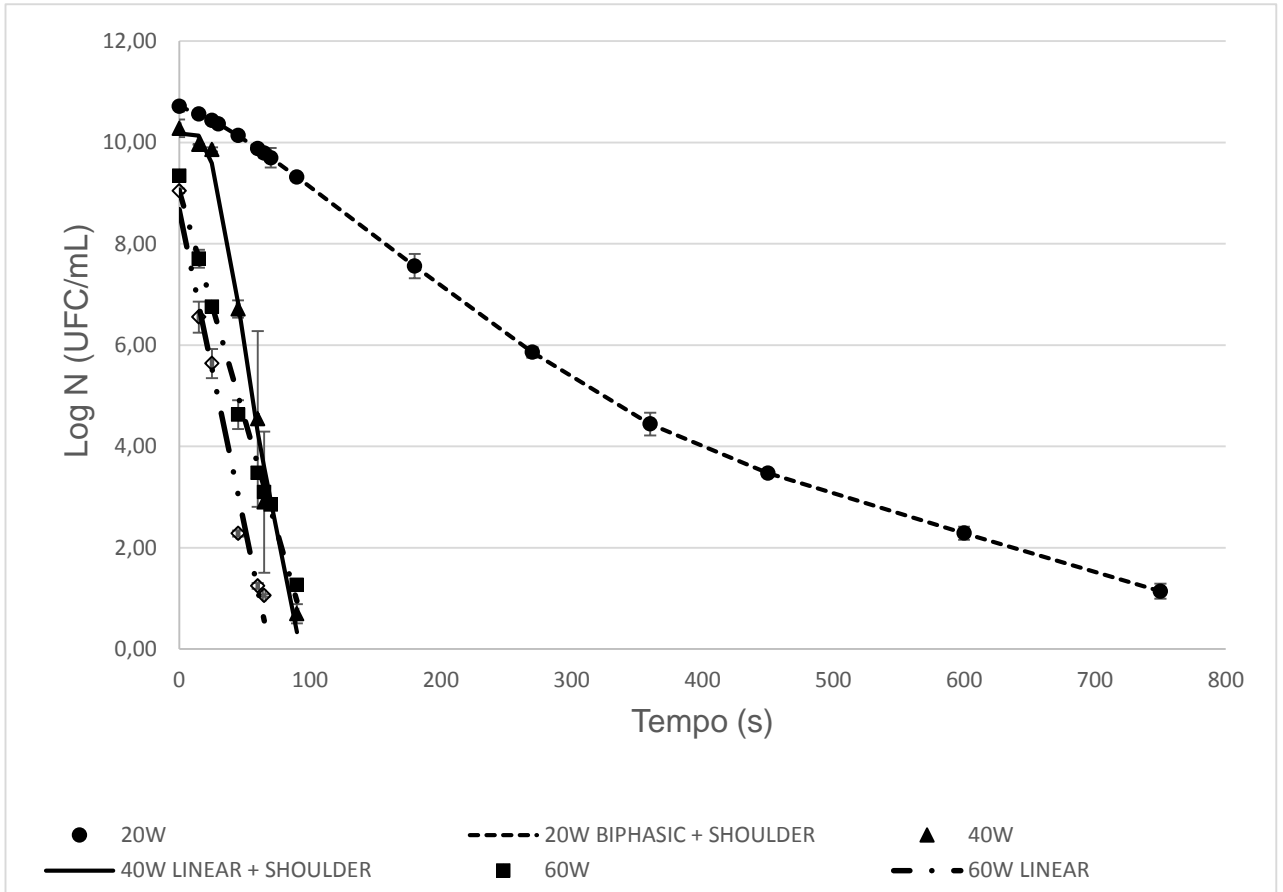


Gráfico 6.2: Melhores modelos ajustados no GlnaFIT.

6.4 Ajuste ao modelo secundário e validação

6.4.1 Dados para a validação

Para a validação, foram utilizadas as potências de 30 e 50 W nos tempos 0 e 180 s, para as 4 cepas. E estes dados, apresentados na tabela 6.4.

A partir disso, para a potência de 30 W, pode-se estimar o valor de $4D$ e D , através da variação na redução da escala logarítmica da população microbiana pelo intervalo de tempo de 180 s. E por sua vez, pode-se obter os valores de $K_{m\acute{a}x}$, conforme foi colocado na tabela 6.5. Com isso, na tabela 6.6, pôde ser observado que para 30W, tornou-se possível a estimativa da resistência relativa da *Salmonella* para diferentes potências (Valor z), a partir da regressão da potência versus o $\log D$.

Já o cálculo de D a 50W foi obtido a partir da equação (6.1).

$$\text{Log } D1 - \text{Log } D2 = \frac{P2 - P1}{z} \quad (6.1)$$

Tabela 6.4: Dados utilizados para a validação.

Cepas da Validação												
	<i>Salmonella Enteritidis</i>			<i>Salmonella Agona</i>			<i>Salmonella Anatum</i>			<i>Salmonella Steinberger</i>		
Potência de 30 W												
	Temperatura (°C)	UFC/ml	log UFC/ml	Temperatura (°C)	UFC/ml	log UFC/ml	Temperatura (°C)	UFC/ml	logUFC/ ml	Temperatura (°C)	UFC/ml	log UFC/ml
Tempo 0 s	28,9±0,00	(6,9*10 ⁷)±0,00	7,8 ± 0,00	30,0 ± 0,00	(1,4*10 ⁸) ± 0,00	8,16 ± 0,00	30,0 ± 0,00	(1,5*10 ⁷) ± 0,00	7,2 ± 0,00	30 ± 0,00	(1,3*10 ⁸) ± 0,00	8,1 ± 0,00
Tempo 180 s	75,0 ± 3,00	(4,6*10 ⁴) ± 360	4,4 ± 0,46	78,5 ± 1,50	(2,6*10 ⁴) ± 875	3,39 ± 0,15	91,5 ± 1,50	(4,1*10 ⁵) ± 371	5,3 ± 0,54	80,5 ± 8,5	(2,7*10 ⁴) ± 600	4,4 ± 0,10
Potência de 50 W												
	Temperatura (°C)	UFC/ml	log UFC/ml	Temperatura (°C)	UFC/ml	log UFC/ml	Temperatura (°C)	UFC/ml	log UFC/ml	Temperatura (°C)	UFC/ml	log UFC/ml
Tempo 0 s	28,9 ± 0,00	(6,9*10 ⁷) ± 0,00	7,8 ± 0,00	30,0 ± 0,00	(1,4*10 ⁸) ± 0,00	8,16 ± 0,00	30,1 ± 0,00	(7,0*10 ⁷) ± 0,00	7,8±0,00	31,0 ± 0,00	(1,3*10 ⁸) ± 0,00	8,1 ± 0,00
Tempo 180 s	87,6 ± 1,17	(2,4*10 ⁴) ± 197	4,1 ± 0,49	87,0 ± 3,00	(2,4*10 ⁴) ± 825	3,35 ± 0,16	91,0 ± 1,00	(1,5*10 ⁵) ± 129	4,8 ± 0,60	87,5 ± 7,50	(1,9*10 ⁴) ± 0,00	4,3 ± 0,00

Tabela 6.5: Parâmetros da cinética de inativação das cepas da validação.

	S. Enteritidis			S. Agona			S. Anatum			S. steinberger		
Potência (W)	Tempo 4D	Tempo D	Kmáx	Tempo 4D	Tempo D	Kmáx	Tempo 4D	Tempo D	Kmáx	Tempo 4D	Tempo D	Kmáx
30	212,2	53,05	0,043	151,01	37,75	0,061	388,7	97,17	0,023	195,47	48,87	0,047
50	194,93	48,73	0,047	149,57	37,4	0,062	238,94	59,73	0,038	188,23	47,06	0,049

Tabela 6.6: Dados e resultados da regressão linear para obtenção do valor z.

								50 W
Sorotipo	Potência (W)	K_{máx}(s⁻¹)	4D (s)	Raiz de K max(s^{-1/2})	D (s)	Log D	Z (W)	Log D
Thyphi	20	0,045	228,8	0,212	51,2	1,709	65,0	1,48
	30	0,041	222,9	0,203	55,7	1,746		
	60	0,210	45,0	0,458	11,0	1,040		
	80	0,285	32,2	0,534	8,1	0,907		
Enteritidis	20	0,045	228,8	0,212	51,2	1,709	66,0	1,47
	30	0,043	212,2	0,208	53,1	1,725		
	60	0,210	45,0	0,458	11,0	1,040		
	80	0,285	32,2	0,534	8,1	0,907		
Agona	20	0,045	228,8	0,212	51,2	1,709	71,0	1,44
	30	0,061	151,0	0,247	37,8	1,577		
	60	0,210	45,0	0,458	11,0	1,040		
	80	0,285	32,2	0,534	8,1	0,907		
Anatum	20	0,045	228,8	0,212	51,2	1,709	58,0	1,55
	30	0,024	388,7	0,154	97,2	1,988		
	60	0,210	45,0	0,458	11,0	1,040		
	80	0,285	32,2	0,534	8,1	0,907		
Steinberger	20	0,045	228,8	0,212	51,2	1,709	67,0	1,47
	30	0,047	195,5	0,217	48,9	1,689		
	60	0,210	45,0	0,458	11,0	1,040		
	80	0,285	32,2	0,534	8,1	0,907		
		Z (Médio)	66,0 W	Desvio Padrão		± 5,0 W		

6.4.2 Ajuste ao modelo de inativação secundário

Para o modelo secundários os dados obtidos para a potência de 40 W foram retirados, uma vez que não geraram um bom ajuste. Logo, foram utilizados os dados das demais potências, conforme tabela 6.7.

Tabela 6.7: Dados para ajuste ao modelo secundário.

Potência (W)	Kmax	raizkmax	4D	log 4D
20	0,045	0,212132034	228,75	2,359361103
60	0,21	0,458257569	45	1,653212514
80	0,285	0,533853913	32,175	1,507518556

A análise matemática destes três pontos, relacionando potência e kmáx originaram os parâmetros (tabela 6.8). Sendo assim o modelo pôde ser gerado através da regressão linear (6.2), (6.3).

$$\sqrt{kmáx} = (0,109412020127795) + (5,4750466004358E - 3) * \text{Potência (W)} \quad (6.2)$$

$$\sqrt{kmáx} = 0,0055 (P + 9,98) \quad (6.3)$$

Tabela 6.8: Dados do modelo secundário de inativação.

Fonte	Valor	Erro padrão	t	Pr> t	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
Intercepto	0,109	0,035	3,164	0,195	-0,330	0,549
Potência (W)	0,005	0,001	9,323	0,068	-0,002	0,013

*XLSTAT 2015.5.01.22595 - Regressão linear - Intervalo de confiança (%): 95 - Tolerância: 0,0001.

6.4.3 Validação

Para a avaliação do ajuste ao modelo secundário, foram utilizados o coeficiente de correlação R2, o erro quadrático médio (MSE), o fator bias e a exatidão. Na tabela 6.9 pode ser observado para a análise feita para o sorotipo Typhi, utilizado na geração do modelo primário, que todos os parâmetros de avaliação apontaram um bom ajuste do modelo secundário, com valores de Bias, exatidão, MSE e R2 de 0,99, 1,10, 0,04 e 0,98 respectivamente.

Os demais sorotipos, utilizados para o desenvolvimento da validação, também demonstraram bons ajustes com valores de bias variando entre 0,95 e 1,05, valores de exatidão entre 1,06 e 1,10, de MSE entre 0,03 e 0,05 e de R² todos iguais a 0,98.

Tabela 6.9: Dados resultantes da validação do modelo secundário.

Sorotipo	bias	exatidão	MSE	R²
Typhi	0,99	1,10	0,04	0,98
Enteritidis	0,98	1,09	0,04	0,98
Agona	0,95	1,06	0,03	0,98
Anatum	1,05	1,16	0,05	0,98
Steinberger	0,98	1,08	0,03	0,98

7 CONCLUSÕES

Os resultados reunidos neste trabalho permitiram a caracterização do comportamento da *Salmonella* sob forma de contaminação de fórmulas lácteas infantis submetidas ao tratamento por micro-ondas.

Todos os tratamentos realizados demonstraram poder de inativação sobre as cepas testadas. O tratamento a 20 W foi caracterizado pela ação ao longo de um intervalo de tempo maior de 750 s, mas não menos eficiente quanto a eliminação do patógeno ao reduzir 9,26 log UFC*mL⁻¹. Para as demais potências, 40; 60 e 80W, as fórmulas resistiram a tempos entre 90 e 120 s, de modo que todas apresentaram bons resultados.

Os modelos primários apresentaram inicialmente perfil bifásico, o que possivelmente ocorreu pois a cepa de *Salmonella* apresentou resistência ao tratamento ou ainda como descrito por Jay ocorreu a proteção das células por componentes presentes em lácteos (JAY, 2005). E, em maiores potências, foram ajustados a modelos lineares, como já era esperado como resposta ao comportamento bacteriano.

Com a estipulação do modelo secundário foi possível determinar como será o comportamento microbiano em função da potência aplicada, ou seja, através da equação predita tornou-se viável relacionar os parâmetros de importância no processo: o tempo, a redução no número de células e a potência.

Por fim, o método foi validado para cepas de *Salmonella*, com diferentes resistências a tratamentos térmicos. Todas demonstraram bom ajuste, indicado que o processo foi bem estabelecido para uso nas fórmulas infantis tendo como foco a inativação deste patógeno.

Conclui-se desta forma, a partir da boa performance demonstrada nos tratamentos, que os modelos foram eficazes na inativação da *Salmonella*, tendo em vista a resistência deste agente no alimento, o que garante um alto nível de segurança contra possíveis veiculações do microrganismo.

8 SUGESTÕES FUTURAS

- Avaliar as características físico químicas da fórmula após o tratamento.
- Construção de modelos preditivos com outros microrganismos também de importância na contaminação deste tipo de alimentos.

9REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E.M.A. **Nutrição em Obstetrícia e Pediatria**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2005.

ACCIOLY, E.; SAUNDERS, C.; LACERDA, E. M. A. **Nutrição em obstetrícia e pediatria**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura médica/Guanabara Koogan, 2009.

ADEKUNTE, A.; VALDRAMIDIS, V.P.; TIWARI, B.K.; SLONE, N.; CULLEN, P.J. **Resistance of Cronobacter sakazakii in reconstituted powdered infant formula during ultrasound at controlled temperatures: a quantitative approach on microbial responses**. PubLMed, 2010; 142 [1-2]:53-9.

ALISSON, E. **Modelagem computacional ajuda a melhorar qualidade e segurança dos alimentos**. Jornal do Brasil – Ciência e Tecnologia: Fapesp, 2013. Disponível em: <<http://www.jb.com.br/ciencia-e-tecnologia/noticias/2013/12/04/modelagem-computacional-ajuda-a-melhorar-qualidade-e-seguranca-dos-alimentos/>>. Acesso em: 20/09/2016.

BANWART, G.J. **Basic foods microbiology**.2nd. New York: Van Nostrand Rheinhold; 1989.

AL-HOLY, M.A; LIN, M; ABU-GHOUSH, M.M; AL-QADIRI, H.M; RASCO, B.A. **Thermal resistance, survival and inactivation of *Enterobacter sakazakii* (cronobacter spp.) In powdered and reconstituted infant formula**. Journal of Food Safety, 2009; 29, 287-301.

ÁLVAREZ, J. R. M. **As Necessidades Alimentares do Lactente e da Mãe. Em Necessidades Nutricionais nas Diferentes Etapas**. Amadora: Instituto Profissional de Estudos em Saúde, 2013; 4: 123–160.

AYMERICH, T.; PICOUET, P. A.; MONFORT, J. M. **Decontamination technologies for meat products**. Meat Science, 2008; 78: 114-129.

BARANYI, J. e ROBERTS, T.A. **A dynamic to predicting bacterial growth in food**. International Journal of Food Microbiology, 1994; 23: 277-294.

BARTNICKI, A. V.; VALDEBENITO-SANHUEZA, M. R.; AMARANTE, T. V. C., CASTRO, S. A. L.; RIZZATTI, R. M.; SOUZA, V. A. J.; **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 2010; 45 : 124. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000187&pid=S0100-4042201400020002300035&lng=en>. Acesso em: 13/01/2016.

BARBOZA, A.C.R.N.; CRUZ, C.V.M.S.; GRAZIANI, M.B.; LORENZETTI, M.C.F.; SABADINI, E. **Aquecimento em forno de micro-ondas/desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais**. Campinas: Rev. Química Nova, 2001; 24 [6]: 901-904.

BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R. **A Focus on the Death Kinetics in Predictive Microbiology: Benefits and Limits of the Most Important Models and Some Tools Dealing with Their Application in Foods**. Foods; 2015; 4: 565-580.

BOSI, M. L. M.; MACHADO, M. T. **Amamentação: um resgate histórico**. Cadernos ESP – Escola de Saúde Pública do Ceará, 2005; 1 [1]: 17-25.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 307, de 14 de novembro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. Brasília: DF: ANVISA, 2002a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3f54b800474597439fb7df3fbc4c6735/RDC+N%C2%BA+307-2002.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 28 de junho de 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n 43, de 19 de setembro de 2011. Regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d8361b804aaa96d79ef6de4600696f00/Resolucao_RDC_n_43_de_19_de_setembro_de_2011.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 14/04/2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2001. Disponível em :<http://www.abic.com.br/publique/media/CONS_leg_resolucao12-01.pdf>. Acesso em: 20/11/2016.

CARROLL, D.E.; LOPEZ, A. **Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems.** J. Food Sci. Champaign, 1969; 34 [5]: 320-324.

Comunidade Europeia (CE). Regulamento N 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005, Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, 22 dez. 2005. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/JOYear.do?year=2005>>. Acesso em: 16/04/2016.

COSTA, M.C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. **Revisão: Tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor.** Curitiba: B.CEPPA, 1999; 17[2]: 187-210.

DANNENHAUER, C.E. **Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva.** Universidade federal de Santa Catarina - Centro Tecnológico. Santa Catarina, 2010.

DE OLIVEIRA, A.P; REZENDE, C.M; SOLA, M.C; FAISTEL, J.C; DE OLIVEIRA, J.J. **Microbiologia Preditiva.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer – Goiânia, 2013; 9 [17]: 190.

DUARTE, J. C. F. **Contribuição da Microbiologia Preditiva na análise de cremes de pasteleiro.** 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008.182p.

FERREIRA, C.S; NETO, V.A; GAKIYAI, E; BEZERRA, R.C; ALARCÓN, R.S.R. **Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease.** São Paulo: Revista Inst. Met. Trop.S.Paulo, 2003; 45 [1].

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. (2008). **Tecnologia de alimentos. Princípios e ações.** São Paulo: Nobel. p.82-114, 129-133, 342-352.

GEERAERD A. H.; VALDRAMIDIS V. P.; VAN IMPE J. F. **GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves** A.H. International Journal of Food Microbiology, 2005; 102 : 95-105.

GERMANO, P.M.L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4ª Edição São Paulo: Varela; 2010.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5.ed. Barueri: Manole, 2015. 1077p.

GUPTA, M.; WONG, W. L. E. (2007). **Microwaves and metals**. Singapore: John Wiley & Sons (Asia) Pte. Ltd.

GURMINI, J.; VIEIRA, M.C. **Fórmulas alimentares no primeiro ano de vida**. *Jornal Paranaense de Pediatria*. 2002. Disponível em: <<http://www.spp.org.br/Jornal/JPed03-02.pdf>>. Acesso em: 17/04/2016.

HA, J.W.; KANG, D.H. **Synergistic bactericidal effect of simultaneous near-infrared radiant heating 261 and UV radiation against Cronobacter sakazakii in powdered infant formula**. *Appl Environ Microbiol*, 2014; 262p.

HINTON, M.H. **Infecções causadas por salmonelas em aves**. In: Anais da Conferência Apinco de Ciência e Tecnologias Avícolas, 1992; Santos (SP). Santos; 1992; 119-122p.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; *et al.* Supplement 2008- 2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minorscheme. *Research in Microbiology*, 2014; 165 [7]: 526–530.

JAKABI, M.; BUZZO, A.A., RISTORI, C.A. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz 1999; 58 [1]: 47-51.

JAY, J.M. **Conservação de alimentos por altas temperaturas e características de microrganismos termofílicos**. In: Jay JM, editor. Porto Alegre: Microbiologia de Alimentos – Artmed, 2005; 6: 365-85.

KINDLE, G.; BUSSE, A.; KAMPA, D.; MEYER-KONIG, U.; DASCHNER, F.D. **Killing activity of microwaves in milk**. *Jornal of Hospital Infection*, 1996; 33 : 273-278.

LACERDA, E. M.; ACCIOLY, E. **Alimentação Complementar do Lactente. Em Nutrição em Obstetrícia e Pediatria.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Lda., 2010; 2: 303–316.

LINHARES, I.W. **Avaliação das condições higiênico - sanitárias no preparo de fórmulas infantis em e lactário hospitalar** [Dissertação] Belo horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.

LÓPEZ-GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, P. S.; PALOP, A.; PERIAGO, P. M.; MARTINEZ-LÓPEZ, A.; MARIN-INIESTA, F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Food Safety Engineering: Na Emergent Perspective.** Food Engineering Reviews, 2009; 1: 84–104.

McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. **Shelf life prediction: status and future possibilities.** **International Journal of Food Microbiology** [online], v. 33, p. 65-83, 1996. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/0168160596011385/1-s2.0-0168160596011385-main.pdf?_tid=3cb9e24c-2888-11e2-a48300000aab0f02&acdnat=1352257817_c94474130f831df9b7a8937bd8285177>. Acesso em: 30/04/2016.

MEZOMO, I.F. **Serviço de nutrição e dietética.** São Paulo: União Social Camiliana, 1987.

MOLINA, J.J.F.; CÁNOVAS, G.V.B.; SWANSON, B.G. **Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor.** Arbor CLXVIII, 661 (Enero 2001), 155-170 pp. Disponível em: <file:///C:/Users/J%C3%A9ssica%20Portela/Downloads/827-833-1-PB.pdf>. Acesso em 17/06/2016.

MORAES, M.S; ARAÚJO, B.C; COSTA, L.E.O; NASCIMENTO, J.S. Avaliação do crescimento de *Salmonella* enterica em fórmulas lácteas infantis sob diferentes condições de preparo e armazenamento. Vigilância Sanitária Debate, 2015; 3 [1] :48-52.

MUSSI-PINHATA, M. M.; REGO, M. A. C. **Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar.** J. Pediatr, 2005; 81 [1]: S59-S68.

NIENOV, A. T.; MACEDO, M. B.; FÉLIX, C.; RAMOS, D.; MOREIRA, Â. N.; SILVA, P. E. A. **Qualidade higiênico-sanitária de formulações ministradas a neonatos.** São Paulo: Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutrição, 2009; 34 [32]: 127-138.

NOVAES, S.F; CONTE-JUNIOR, C.A; FRANCO, R.M; MANO, S.B. **Influência das novas tecnologias de conservação sobre os alimentos de origem animal.** Ano 10: Revista científica eletrônica de medicina veterinária, 2012. Número 19 - Periódicos Semestral.

OKAZAKI, M.M; HORITA, H.C; IMAZAKI, F.T; MORELI, S.A; SILVA, G.C; CARDOSO. G.M. **Qualidade Microbiológica de Fórmulas Lácteas Infantis em Pó Reconstituídas em Lactários Hospitalares da Região de Campinas.** São Paulo: Microal Blucher Food Science Proceedings, 2014; 1 [1].

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Amamentação. [online]. Junho de 2003. [citado 04 mar 2007]. Disponível em:<<http://www.opas.org.br/sistema/fotos/amamentar.pdf>>. Acesso em 22/06/2016.

PELEG, Micha. **Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems: models for Predicting Growth and Inactivation.** CRS Series in Contemporary Food Science. Taylor & Francis Group. 2006.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A. **Predictive Microbiology in Foods.** Londres 2013.

PINA-PÉREZ, M.C.; TINOCO, M.B.; DOLORES, R.; MARTINEZ, A. ***Cronobacter sakazakii* inactivation by microwave processing.** Food and Bioprocess Technology, 2014; 7 [3].

ROSSI ,P.; KABUKI, D.Y ;KUAYE, A.Y. **Avaliação microbiológica do preparo de fórmula láctea infantil em lactário hospitalar.** São Paulo: Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.), 2010; 69 [4].Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007398552010000400010&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 17/04/2016.

ROWLANDS, R.E.G; PAPASIDERO, A.A.S; De PAULA, A.M.R; CANO, C.B; GELLI, D.S. Resistência térmica de *Salmonella Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída. Revista Instituto Adolfo Lutz, 2006; 65 [1]:36-39.

SANT'ANA, A.S. **Avaliação quantitativa do risco de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em vegetais minimamente processados.** [dissertação de Doutorado]. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2011.

SANTOS, B. H. C.; SOUZA, E. L.; SOUZA, C. P.; SERRÃO, L. H.; AMARAL, W. C. Manipuladores como Causas Potenciais de Contaminação Microbiana de Alimento Enteral. *Infarma*, 2004; 15: 11-12.

SANTOS, R.F.S. **Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades da região de Campinas/SP.** [dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2006.

SARMENTO, C.M.P. **Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Vida de Prateleira de mortadela e linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico.** 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SILVA Jr, E.A. **Manual do controle higiênico sanitário em alimentos.** São Paulo: Varela, 2001; 4ª ed.

SILVA, M.P. **Avaliação dos efeitos da radiação gama na conservação da qualidade de amora-preta (*Rubus spp. L.*).** Jaboticabal – SP : *Rev. Bras. Frutic.*, 2014; 36 [3].

SOARES, Humberto. Novas tecnologias no processamento de alimentos: quais as tendências para o futuro próximo? *Food Safety Brazil – Segurança de Alimentos*, 2016. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/novas-tecnologias-no-processamento-de-alimentos-quais-as-tendencias-para-o-futuro-proximo/>>. Acesso em: 10/01/2017.

SOUZA, Poliana Mendes de. **Estudo comparativo da pasteurização de leite pelo método convencional e por micro-ondas.** Sistema de Bibliotecas da Unicamp – SBU. São Paulo, 2007. Disponível em <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000415805>>. Acesso em: 01/07/2016.

STROOP, W.G.; SCHAEFER, D.C. **Comparative effect of microwaves and boiling on the denaturation of DNA.** Nova Iorque: *Anal. Biochem.*, 1989, 182 [2]: 222-225.

VALERO, A; CEJUDO, M; GIMERO; R.M Garcia. **Inactivation kinetics for Salmonella Enteritidis in potato omelet using microwave heating treatments.** Food Control, 2014; 43: 175–182 p.

VEGA-MERCADO, H., MARTÍN-BELLOSO, O., QIN, B.L., CHANG, F.J., GÓNGORA-NIETO, M.M., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., SWANSON, B.G. **Non-thermal food preservation: pulsed electric fields.** Trends in Food Science & Technology, v. 8, p. 151-156, 1997.

VINAGRE, R.D.; DINIZ, E.M.A.; VAZ, F.A.C. **Leite humano: um pouco de sua história.** Pediatria, São Paulo, 2001.

Disponível em: < <http://www.pediatrasiapaulo.usp.br/upload/pdf/543.pdf>>. Acesso em: 17/04/2016.

REA, M.F. **Substitutos do leite materno: passado e presente.** Rev. Saúde Pública v.24 n.3 São Paulo jun. 1990.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101990000300011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 17/04/2016.

WHITING, R. C. **Microbial modelling in foods.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1995; 35:467-494p.

WOO, I.; RHEE, I.; PARK, H. **Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure.** Whashington: Appl. Environm. Microbiol., 2000; 66 [5]: 2243-2247p.

WU, F.M;BEUCHAT, L.R; DOYLE, M.P;MINTZ, E.D; WELLS, J.G;SWAMINATHAN, B. **Survival and growth of *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *Vibrio cholerae* O1 in reconstituted infant formula.** Am J Trop Med Hyg, 2002; 66: 782-786.

WU, T. **Environmental perspectives of microwave applications as remedial alternatives: review.** Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management, 2008; 12 [2] :102-115p.