



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS MORRINHOS

ELIENE VAZ FERNANDES

**EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Clostridium botulinum* NÃO
PROTEOLÍTICO EM PURÊ DE COUVE-FLOR**

Morrinhos

2022

ELIENE VAZ FERNANDES

**EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Clostridium botulinum* NÃO
PROTEOLÍTICO EM PURÊ DE COUVE-FLOR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em
Alimentos, do Instituto Federal Goiano - Campus
Morrinhos, como pré-requisito para a obtenção do grau de
Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Wiaslan Figueiredo Martins.

Coorientadora: Profa. Ma. Patrícia Barêa Barroso.

Morrinhos

2022

ELIENE VAZ FERNANDES

**EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Clostridium botulinum* NÃO
PROTEOLÍTICO EM PURÊ DE COUVE-FLOR**

Aprovada em 08 de abril de 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

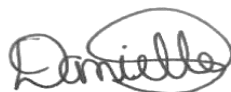
Prof. Dr. Wiaslan Figueiredo Martins
IF Goiano – Campus Morrinhos
(Orientador)



Profa. Ma. Patrícia Barêa Barroso
IF Goiano – Campus Morrinhos
(Coorientadora)



Alessandra Cristina Tomé
IF Goiano – Campus Morrinhos
(Membro interno)



Danielle de Sousa Severo
Universidade Federal de Santa Catarina
(Membro externo)

Morrinhos

2022

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

FEL42e Fernandes, Eliene Vaz
 EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE
Clostridium botulinum NÃO PROTEOLÍTICO EM PURÊ DE
COUVE-FLOR / Eliene Vaz Fernandes; orientador
Wiaslan Figueiredo Martins; co-orientadora Patrícia
Barêa Barroso. -- Morrinhos, 2022.
 35 p.

TCC (Graduação em Tecnologia em Alimentos) --
Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, 2022.

1. Produtos vegetais. 2. Patógenos. 3. Segurança de
alimentos. 4. Microbiologia preditiva. I. Figueiredo
Martins, Wiaslan, orient. II. Barêa Barroso,
Patrícia, co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO

PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Eliene Vaz Fernandes

Matrícula:

2016104210310172

Título do trabalho:

EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Clostridium botulinum* NÃO PROTEOLÍTICO EM PURÊ DE
CERVEJA DE +

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: | / | / |

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Morrinhos, Goiás

Local

06/05/2022

Data

Eliene Vaz Fernandes

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

WIASLAN FIGUEREDO
MARTINS.07175991401

Assinado de forma digital por WIASLAN FIGUEREDO
MARTINS.07175991401
Dados: 2022.05.06 13:43:23 -03'00'

Assinatura do(a) orientador(a)

Anexo 8
Ata da Defesa

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CURSO – TC

No dia 8 de abril de 2022 às 20 horas, pela interface de comunicação *Google Meet*, desenvolvido pela empresa *Google*, ocorreu a banca de defesa do trabalho de curso (TC) intitulado **Efeito da temperatura no crescimento de *Clostridium botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor**, da aluna Eliene Vaz Fernandes, sob a orientação do professor Dr. Wiaslan Figueiredo Martins e coorientação da Ma. Patrícia Barêa Barroso do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. A banca de avaliação foi composta pelos membros, Alessandra Cristina Tomé e Danielle de Sousa Severo.

A média obtida foi 9,7 (nove vírgula sete), sendo considerada a aluna

- aprovada sem ressalvas.
- aprovada com ressalvas.
- não foi aprovada.

Morrinhos, 8 de abril de 2022

WIASLAN FIGUEIREDO
MARTINS.071.75991401

Assinado digitalmente por WIASLAN FIGUEIREDO
MARTINS.071.75991401
Data: 2022.04.08 15:26:11 -0300

Professor Orientador



Membro da Banca de Avaliação



Membro da Banca de Avaliação

AGRADECIMENTOS

Eu queria agradecer a todos os professores pelo aprendizado, todos os amigos e colegas que conheci nesta jornada, ao meu esposo pela paciência, á minha família pela compreensão, apoio e por acreditarem em mim.

E principalmente á Deus pela força e fé de cada dia para cada momento de dificuldade e momentos em que pensei em desistir.

Obrigada!

RESUMO

O botulismo é resultante da ação de uma toxina produzida pelo *Clostridium botulinum*, que já tem a toxina pré-formada. É caracterizada como uma doença grave, com evolução aguda, e que provoca alterações digestivas e neurológicas no indivíduo, apresenta como sintomas a falência respiratória seguida de óbito. Os vegetais apesar de serem consumidos crus, são também encontrados na forma de enlatados, apresentando maior vida útil, quando comparados aos vegetais frescos, porém estes processos podem desencadear a agregação de uma ampla gama de espécies microbianas, incluindo patógenos, como por exemplo nos purês. Objetivou-se, com este trabalho, estimar o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor, utilizando o modelo *software Microrisk Lab*. Os dados de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico foram colhidos e analisados nas temperaturas de 5 °C, 8 °C, 10 °C e 16 °C e pH 5,56, adquiridos da pesquisa de Carlin e Peck (1996), disponíveis na base de dados *ComBase* e os modelos de Baranyi e Roberts e Gompertz foram ajustados às curvas de crescimento utilizando o *MicroRisk Lab*. Ao analisar os resultados, pode-se concluir que os modelos primários de Baranyi e Roberts e Gompertz apresentaram bom desempenho para descrever o crescimento de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor, com bons índices estatísticos. Além disso, os modelos secundários descreveram bem a influência da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento de *C. botulinum*, com destaque para o modelo Exponencial. Conclui-se que a aplicação de modelos preditivos e *software* de fácil utilização podem auxiliar na identificação de patógenos contaminantes de produtos vegetais, em diferentes condições de armazenamento, sem a necessidade de realização de vários experimentos para determinar a segurança do produto.

Palavras-chave: Produtos vegetais, patógeno, segurança de alimentos, microbiologia preditiva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 COUVE-FLOR	13
3.1.1 Purê de couve-flor	13
3.2 CONTAMINAÇÃO EM PRODUTOS DE VEGETAIS.....	14
3.2.1 <i>Clostridium botulinum</i> em vegetais	15
3.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA	16
3.3.1 <i>Software MicroRisk Lab</i>	17
4. METODOLOGIA	19
4.1 DADOS DE CRESCIMENTO.....	19
4.2 MODELAGEM PRIMÁRIA	19
4.3 MODELAGEM SECUNDÁRIA	20
4.4 ANÁLISES NUMÉRICAS	20
4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODELOS.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Clostridium botulinum* pode ser produzida por sete grupos fisiologicamente e filogeneticamente distintos de clostrídios. As cepas não proteolíticas dessa bactéria representam um perigo significativo, quando encontradas em produtos submetidos a processamentos térmicos suaves, por exemplo, produtos *sous-vide*, alimentos processados refrigerados de longa durabilidade, porém, também pode estar presente nos vegetais cozidos (CARLIN; PECK, 1996).

O botulismo é resultante da ação de uma toxina produzida pelo *C. botulinum*, que já tem a toxina pré-formada. É caracterizada como uma doença grave, com evolução aguda, e que provoca alterações digestivas e neurológicas no indivíduo, apresenta como sintomas a falência respiratória seguida de óbito (VIANA; SANTOS; VIANA, 2019).

Segundo Spinia et al. (2015), o *C. botulinum*, bactéria Gram-positiva, com formato esporulado, encontra-se naturalmente em diversos ambientes (solo, água, mel, pólen, legumes frescos e cozidos e especiarias), se desenvolvendo bem em condições de anaerobiose, principalmente, em elevada atividade de água. Já foram descritos sete tipos dessa bactéria, indicados pelas letras A, B, C, D, E, F e G, que se diferenciam entre si pelas características antigênicas da neurotoxina que cada grupo produz, embora possuam ação farmacológica similar. Os tipos A, B, E e F são as mais tóxicas para o ser humano. Quando encontradas em condições de anaerobiose, elevada atividade de água e pH superior a 4,5, a bactéria produz uma toxina potencialmente fatal. Os esporos de *C. botulinum* são destruídos à temperatura de esterilização (120 °C por 30 minutos).

O crescimento de *C. botulinum* não proteolítico já foi observado em vários alimentos (KETCHAM; GOMEZ, 2003). Durante este trabalho, veremos o comportamento de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor (CARLIN; PECK, 1996).

A couve-flor é um vegetal com excelente fonte de compostos biologicamente ativos, que por sua vez agem na prevenção de inúmeras doenças como, por exemplo, cardiovasculares, cânceres, diabetes e outras doenças crônicas. Existem diversas cultivares de couves-flores na agricultura, porém, as de coloração branca são as mais cultivadas e consumidas atualmente, por apresentarem quantidades significativas de vitaminas (C, B₁, B₂ e B₃), fenólicos, glicosinolatos, fibras, minerais e compostos biologicamente ativos (KALISZ et al., 2018).

No caso do purê de couve-flor, o vegetal é cozido para ser preparado, e esse cozimento pode ser realizado através de várias etapas, como, por exemplo, o de *sous-vide*, técnica em que os alimentos são cozidos á vácuo. Porém, o cozimento pode gerar vários aspectos negativos ao produto, como a perda de nutrientes e do sabor do vegetal. Além disso, na técnica de *sous-vide* o processo é realizado

abaixo de 100 °C, podendo permanecer vivos os micro-organismos prejudiciais à saúde do indivíduo, como o *C. botulinum* (CASEMIRO; ZAMBIZI; VENDRAMINE, 2020).

A microbiologia preditiva pode ser uma importante ferramenta para descrever, de forma quantitativa, os efeitos dos fatores (intrínsecos e/ou extrínsecos) no crescimento ou inativação dos micro-organismos nos alimentos. Para tanto, são construídos modelos matemáticos que auxiliam na obtenção de dados sobre esses comportamentos (DANNENHAUER, 2010). Essa ferramenta pode auxiliar as indústrias na avaliação da segurança de seus produtos, principalmente quando ocorre interrupção da cadeia do frio, provocada por um desvio de resfriamento, atingindo temperaturas de abuso (JUNEJA et al., 2021).

O programa *ComBase* (COMBASE, 2022) é um dos mais utilizados e de acesso gratuito. É uma ferramenta *online* gratuita, compreendendo um conjunto de modelos de previsão de respostas de patógenos importante de origem alimentar ou de muitos micro-organismos deteriorantes em função de fatores ambientais, incluindo a temperatura e o pH. Recentemente, um sistema de modelagem *online* que integra modelos preditivos microbianos abrangentes, o *microrisk Lab*, foi desenvolvido para a estimação de parâmetros e simulação de modelos em microbiologia preditiva (LIU et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Modelar o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento de purê de couve-flor no crescimento de *Clostridium botulinum* não proteolítico, utilizando o *software Microrisk Lab*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento dos dados de crescimento de *C. botulinum* disponíveis na base de dados *Combase*;
- Ajustar o modelo primário às curvas de crescimento de *C. botulinum* obtidas em diferentes temperaturas de armazenamento, considerando faixa de temperatura de 5 °C, 8 °C, 10 °C e 16 °C e avaliar o seu desempenho por meio dos índices estatísticos;
- Avaliar a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento de *C. botulinum* por meio do ajuste de modelos secundários e selecionar o melhor modelo que descreva essa influência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COUVE-FLOR

A couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) pertence à família Brassicaceae (Cruciferae) e dentre as espécies pertencentes à mesma família, destacam-se o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), os brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*), a couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*) e a couve-chinesa (*Brassica rapa* var. *pekinensis*) (MELO et al., 2017).

O Brasil, apesar de não estar no *ranking* dos maiores produtores mundiais de couve-flor, tem uma produção considerável, especialmente nas regiões Sudeste e Sul, onde é mais cultivada. A produção nacional de couve-flor é de 140.067 toneladas, sendo feita em mais de 19.646 estabelecimentos agropecuários, de acordo com último censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017).

São Paulo é o principal Estado produtor de couve-flor no Brasil, com cerca de 36.338 toneladas. O Rio de Janeiro é o segundo (36.219 toneladas) seguido pelo Paraná (17.182 toneladas). O estado de Goiás ocupa a 9ª posição, com uma produção de cerca de 2.159 toneladas (IBGE, 2017).

Todas as espécies da família Brassicaceae são compostas por plantas cosmopolitas, com importância socioeconômica de grande relevância, protagonistas da melhoria de dietas alimentares e da prevenção de doenças, como a couve-flor (MELO et al., 2017).

3.1.1 Purê de couve-flor

A couve-flor é vendida, predominantemente, fresca como a maioria dos vegetais, é altamente propensa à deterioração pós-colheita. O processamento é um dos vários meios tecnológicos possíveis para aumentar, significativamente, sua vida útil e possibilitar a disponibilidade durante todo o ano. Além disso, o processamento aumenta sua palatabilidade e estabilidade, adiciona variedade de produtos, aumenta a geração de renda e impulsiona a agregação de valor (AUGUSTIN et al., 2016), como por exemplo, na elaboração de purê.

A polpa que contém pasta viscosa à base de fruta ou vegetal obtida pelo processamento mecânico seguido de calor, a partir de frutas ou vegetais maduros, é conhecida como purê. Praticamente toda fruta ou vegetal pode produzir suco se necessário; porém, para muitas frutas e vegetais, o purê apresenta um maior apelo comercial (BATES; MORRIS; CRANDALL, 2001).

As técnicas comuns de processamento direcionadas à preservação a longo prazo de couve-flor envolvem branqueamento, enlatamento, secagem e congelamento (KORUS, 2013). Para muitos

produtos alimentícios, o processamento térmico pode resultar em perdas significativas do valor nutricional, bem como induzir alterações prejudiciais nos atributos sensoriais dos produtos. Isso sem falar nas mudanças de qualidade que se desenvolvem durante o armazenamento (ALBANESE et al., 2007; BAHÇECI et al., 2005).

3.2 CONTAMINAÇÃO EM PRODUTOS DE VEGETAIS

Os vegetais abrigam uma ampla gama de espécies microbianas, incluindo os patógenos. A contaminação natural de vegetais com bactérias patogênicas causa regularmente surtos de intoxicação ou infecção alimentar (NGUYEN-THE; CARLIN, 2000). O tratamento térmico recebido durante a cozedura (ou seja, alguns minutos a temperaturas superiores a 90 °C) eliminará bactérias, leveduras e bolores das células vegetais, enquanto os esporos resistentes ao calor de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. sobreviverão, pelo menos em parte. O processamento de alimentos refrigerados cozidos não termina com cozimento dos vegetais. Depois de cozidos, os vegetais podem ser contaminados nas misturas com outros ingredientes, por contaminação cruzada (CARLIN, 2002).

A microbiota de alimentos refrigerados cozidos, como os purês, é geralmente pouco documentada. As razões para isso são, principalmente, porque o desenvolvimento desses alimentos é relativamente recente e pela ausência de produtos genéricos, devido à diversidade de receitas e processos. A microbiologia dos alimentos *sous-vide* (cozimento a vácuo, geralmente em temperatura mínima de 54,4 °C), devido à ausência de recontaminação após o cozimento ou aquecimento subsequente, pode ser representativa da microbiota específica de alimentos refrigerados cozidos contendo vegetais (FELLOWS, 2019).

As bactérias de maior preocupação em alimentos cozidos a vácuo são aquelas que formam esporos e podem se multiplicar na ausência de oxigênio enquanto o alimento está sendo aquecido na temperatura de processamento. Dentre essas, inclui o *C. botulinum* não proteolítico, que se desenvolve em temperaturas entre 3,3 e 45 °C em alimentos embalados a vácuo (FELLOWS, 2019).

Trabalhos extensivos têm sido feitos em purês de vegetais cozidos, pasteurizados e resfriados de origem comercial (CARLIN et al., 2000b; CHOMA et al., 2000; GUINEBRETIERE et al., 2001).

Os micro-organismos que apresentam um risco de segurança em alimentos refrigerados cozidos contendo vegetais têm as seguintes características: eles são contaminantes naturais de vegetais crus; eles foram implicados em surtos de intoxicação alimentar após o consumo de alimentos à base de vegetais; eles são capazes de sobreviver, pelo menos até certo ponto, ao tratamento térmico suave recebido pelos produtos durante o processamento e são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração (LUND; PECK, 2000).

A lista de bactérias que atendem a essas condições é bastante grande. No entanto, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *C. botulinum*, segundo a maioria dos especialistas, são a maior preocupação devido à contaminação natural, capacidade de crescer em baixas temperaturas e alta resistência ao calor (ACMSF, 1992; PECK, 1997; CARLIN et al., 2000a).

3.2.1 *Clostridium botulinum* em vegetais

Pesquisas para a presença de *C. botulinum* mostram que 100% das amostras de vegetais frescos são positivas, com um nível máximo de contaminação, provavelmente, inferior a um esporo de *C. botulinum*/g (NOTERMANS, 1993; LUND; PECK, 2000). Essa espécie de bactéria foi implicada em surtos de intoxicação alimentar após o consumo de alimentos à base de vegetais, tanto em vegetais frescos, minimamente processados, quanto em vegetais processados termicamente.

Os endósporos produzidos por *C. botulinum* conferem alta resistência ao processo de calor aplicado a alimentos refrigerados cozidos. Algumas cepas de *C. botulinum* (Grupo II ou cepas não proteolíticas) são capazes de crescer em temperaturas tão baixas quanto 3 °C (ICMSF, 1996; LUND; PECK, 2000).

C. botulinum tem uma forte capacidade de crescer em substrato vegetal, mesmo em baixa temperatura. O crescimento de *C. botulinum* foi demonstrado em uma variedade de substratos vegetais cozidos, em temperaturas próximas à temperatura mínima de crescimento. Em geral, a maioria dos vegetais cozidos em pH acima de 4,6 (5,0) parece ser capaz de sustentar o crescimento e a produção de toxinas pelo *C. botulinum* não proteolítico, qualquer que seja o valor nutricional suposto (CARLIN; PECK, 1995, 1996). O aquecimento dessa bactéria em substratos vegetais afeta a resistência ao calor apenas marginalmente, sendo as maiores diminuições observadas em substratos vegetais ácidos. No entanto, alguns efeitos específicos causados por vegetais são observados em *C. botulinum* não proteolítico (CARLIN, 2002).

Várias cepas de *C. botulinum* não cresceram em substrato vegetal em temperaturas (15 °C para *C. botulinum* proteolítico do Grupo I e 10 °C para *C. botulinum* não proteolítico do Grupo II) substancialmente superior à temperatura mínima de crescimento, enquanto crescimento foi detectado em caldo nutriente após alguns dias de incubação (CARLIN; PECK, 1996; BRACONNIER, 2001). Essas diferenças não se devem apenas ao pH, pois vegetais com pHs semelhantes mostraram diferenças marcantes no potencial de crescimento dessa bactéria. No entanto, o tempo para a produção de toxina de *C. botulinum* em alimentos à base de vegetais está na faixa relatada para outros grupos de alimentos (por exemplo, carne, peixe e aves) (CARLIN, 2002).

Stringer, Fernandes e Metris (2012) relataram a falta de informações sobre o crescimento e a letalidade térmica de patógenos vegetativos entre 40 e 60 °C e examinaram a possibilidade de expandir modelos *ComBase* (um banco de dados para microbiologia de alimentos quantitativa e preditiva) (COMBASE, 2022) para bactérias em alimentos cozidos a vácuo.

3.3 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva, na área de alimentos, é aplicada para manutenção da segurança do alimento na cadeia de produção e distribuição de alimentos. Os primeiros trabalhos científicos sobre microbiologia preditiva datam do início da década de 1920, quando se estudou a cinética de inativação de esporos de *C. botulinum* durante tratamentos isotérmicos (BIGELOW, 1921; BIGELOW; ESTY, 1920; FAKRUDDIN; MAZUMDER; MANNAN, 2011; PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013; SCHLEI et al., 2018).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta importante para garantir a segurança de alimentos, possibilitando estimar as consequências das operações de manipulação, processamento e armazenamento de alimentos sobre o crescimento, sobrevivência e inativação de micro-organismos (USDA, 2016). Pode ser utilizada para a estimativa da vida útil de alimentos (BRUCKNER et al., 2013) e para avaliação da alteração de fatores na formulação e armazenamento de novos produtos (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013).

A microbiologia preditiva, usada como método capaz de estimar a concentração do micro-organismo em um alimento na perspectiva matemática, pode ser classificada de acordo com sua representação, podendo ser primária, secundária ou terciária (BUCHANAN, 1993). Na primária é representada a relação direta entre a concentração microbiana e o tempo sob parâmetros cinéticos, como por exemplo, tempo de latência (ou fase *lag*), velocidade específica máxima de crescimento, parâmetros de inativação, dentre outros. O modelo secundário tem como objetivo descrever a influência das condições ambientais sobre os parâmetros cinéticos e, por fim, os modelos terciários se detêm na utilização de *softwares* capazes de realizarem a consolidação dos dados obtidos nos modelos primários e secundários (BARANYI; BUSS, 2017).

Sobre os modelos terciários, as ferramentas *online* gratuitas, nomeadamente, o *DMFit online* do *ComBase* (COMBASE, 2022) e o *Bioinactivation FE* (GARRE et al., 2018) podem ser facilmente acessadas por meio de diferentes dispositivos conectados à internet, o que proporciona a capacidade de multiplataforma aos usuários. Por outro lado, alguns sistemas de modelagem colocam mais ênfase em simular ou prever o nível de concentração bacteriana sob diferentes condições ambientais, que têm algum significado de referência para avaliação e gerenciamento de risco microbiano. As

conhecidas ferramentas gratuitas, o *Pathogen Modeling Program* (USDA, 2016) e o *ComBase Predictor* (COMBASE, 2022), apoiadas por seu extenso banco de dados de micro-organismos-alimentos, foram aplicadas para prever o comportamento microbiano em meio de cultura ou em diferentes matrizes alimentares. A aplicabilidade de um modelo terciário é muito dependente da quantidade e qualidade do conhecimento disponível integrado ao sistema de modelagem, como dados de teste de desafio experimental, tipos de modelo e parâmetros de modelo associados.

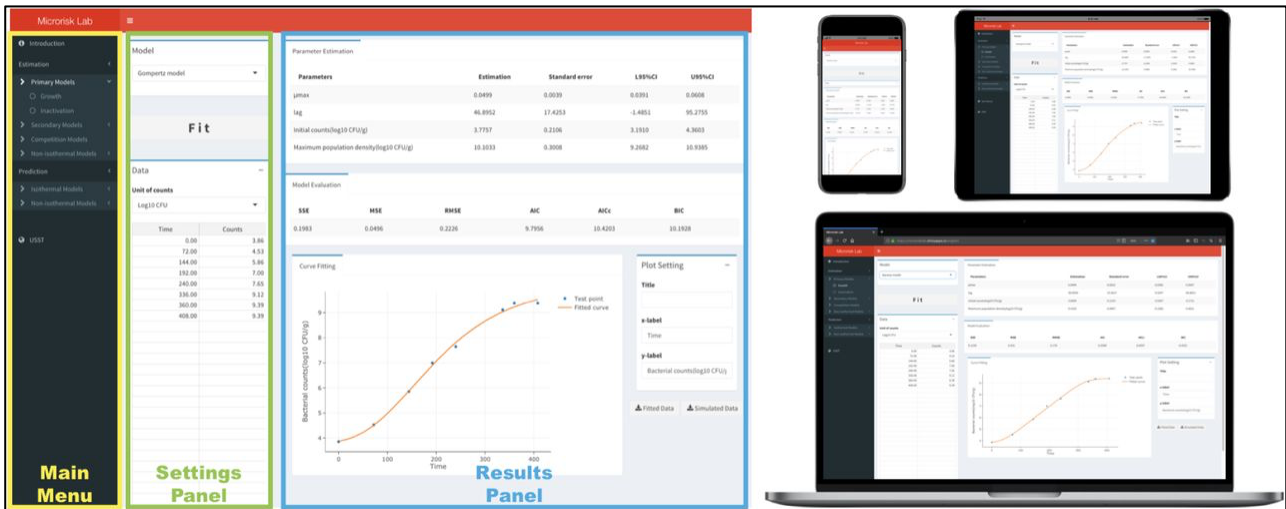
Recentemente, foi projetado o *software Microrisk Lab* (LIU et al., 2021) como um aplicativo da Web baseado em R, com uma interface amigável para realizar estudos de estimativa de parâmetros ou simulação de modelos em microbiologia preditiva.

3.3.1 Software *MicroRisk Lab*

O *MicroRisk Lab* é um banco de dados sistematicamente formatado que apresenta respostas microbianas quantificadas em relação ao ambiente alimentar com mais de 60.000 registros e utiliza *ComBase Predictor* e *Food Models* – para prever o crescimento e a inativação de micro-organismos em alimentos (LIU et al., 2021). Segundo os autores, esse banco de dados foi projetado como uma espécie de *freeware* de modelagem interativa para a realização de parâmetros que estimam e simulam modelos em microbiologia preditiva.

O *MicroRisk Lab* foi desenvolvido com base na linguagem de programação R e no servidor 'Shinyapps.io', além de ser projetado como um *software* totalmente responsivo com interface para os dispositivos conectados à internet. Nessa ferramenta, pode ser utilizado um total de 36 modelos revisados por pares integrando uma estimativa de parâmetros (incluindo modelos primários, secundários e modelos de velocidade e competição de crescimento de duas microbiotas) e simulação de modelo. Cada seção de modelagem está projetada para fornecer resultados numéricos e gráficos com apresentação de indicadores estatísticos abrangentes, dependendo do conjunto de dados e/ou configuração de parâmetro apropriado (LIU et al., 2021). A interface gráfica do usuário simples e a saída interativa podem se adaptar automaticamente a diferentes tamanhos de tela, como representado na Figura 1.

Figura 1 - Visão geral do layout do *Microrisk Lab* e sua interface visual em diferentes dispositivos conectados à internet, demonstrando o Menu, o painel de configurações e o painel de resultados.



Fonte: Liu et al. (2021).

4. METODOLOGIA

4.1 DADOS DE CRESCIMENTO

Os dados de crescimento em diferentes temperaturas foram obtidos do navegador *ComBase* (www.combase.cc), utilizando a categoria de alimento “*vegetable or fruit and their products*”, o micro-organismo “*Clostridium botulinum*” e a faixa de temperatura entre 5 e 16 °C. Foram selecionados dados do crescimento (\log_{10} UFC/g) de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor (pH = 5,56) em quatro temperaturas de armazenamento: 5 °C, 8 °C, 10 °C e 16 °C. Os dados foram reportados da pesquisa de Carlin e Peck (1996), intitulada “*Growth of and Production by Nonproteolytic Clostridium botulinum in Cooked Purréed Vegetables at Refrigeration Temperatures*”, publicada no periódico “*Applied and environmental microbiology*”.

4.2 MODELAGEM PRIMÁRIA

Os modelos matemáticos primários selecionados estão representados pelas Equações 1 a 4, sendo um modelo puramente sigmoide, Gompertz (GOM) (Equação 1) (ZWIETERING et al., 1990), e um modelo sigmoide com função de ajuste, Baranyi e Roberts (BAR) (Equações 2, 3 e 4) (BARANYI; ROBERTS, 1994). Os modelos foram ajustados às curvas experimentais de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor em diferentes temperaturas utilizando o *Microrisk Lab* (<https://microrisklab.shinyapps.io/english/>).

$$\text{GOM} \quad Y(t) = Y_0 + (Y_{m\acute{a}x} - Y_0) \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2,71\mu_{m\acute{a}x}(t_{lag} - t)}{Y_{m\acute{a}x} - Y_0} + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

$$Y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x}A(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{e^{\mu_{m\acute{a}x}A(t)} - 1}{e^{y_{m\acute{a}x} - y_0}} \right\} \quad (2)$$

$$\text{BAR} \quad A(t) = t + \left(\frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \right) \ln \left[e^{(-\mu_{m\acute{a}x}t)} + e^{(-\mu_{m\acute{a}x}t_{lag})} - e^{(-\mu_{m\acute{a}x}t - \mu_{m\acute{a}x}t_{lag})} \right] \quad (3)$$

$$h_0 = \mu_{m\acute{a}x}t_{lag} \quad (4)$$

Nas equações, $Y(t)$ é o logaritmo da concentração microbiana N (UFC/g) no tempo t (horas), ou seja, $y(t) = \log [N(t)]$. O parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1}); t_{lag} é a duração da fase de latência (h); y_0 é o logaritmo da concentração microbiana inicial, $y_0 = \log (N_0)$;

$y_{m\acute{a}x}$ é o logaritmo da população máxima, $y_{m\acute{a}x} = \log(N_{m\acute{a}x})$; h_0 é o parâmetro relacionado ao estado fisiológico das células (adimensional); $A(t)$ é a função de ajuste do modelo Baranyi e Roberts.

4.3 MODELAGEM SECUNDÁRIA

Os modelos secundários exponencial e raiz quadrada (Equações 5 e 6, respectivamente) foram usados para descrever o efeito da temperatura na velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), em que a e b são parâmetros empíricos, T é a temperatura de armazenamento (°C) e $T_{m\acute{i}n}$ é a temperatura teórica mínima de crescimento (°C).

$$\mu_{m\acute{a}x} = ae^{(bT)} \quad (5)$$

$$\sqrt{\mu_{m\acute{a}x}} = a(T - T_{m\acute{i}n}) \quad (6)$$

4.4 ANÁLISES NUMÉRICAS

Os ajustes dos modelos primários aos dados experimentais de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor nas temperaturas de armazenamento entre 5 °C e 16 °C foram realizados no *software MicroRisk Lab online* versão 1.0. O ajuste foi realizado em apenas uma etapa, obtendo os parâmetros $\mu_{m\acute{a}x}$, t_{lag} , y_0 e $y_{m\acute{a}x}$.

Os valores estimados, os erros padrão e os intervalos de confiança inferior e superior de 95% (Equação 7) foram determinados pelo pacote R de “*stats*” e “*nlstool*”.

$$\left\{ \begin{array}{l} L95\%IC = \hat{\beta} - t_{95\%,df} \times \text{MSE} \times \hat{B} \\ U95\%IC = \hat{\beta} + t_{95\%,df} \times \text{MSE} \times \hat{B} \\ t_{95\%,df} = t_{95\%,\infty} \approx 1,96 \end{array} \right. \quad (7)$$

Em que, $\hat{\beta}$ é o parâmetro estimado; MSE é a soma média do erro quadrado; \hat{B} é o inverso da matriz de segundas derivadas da função log-probabilidade (*log-likelihood*) em função de β avaliada nas estimativas dos parâmetros $\beta = \hat{\beta}$; df é grau de liberdade, que é assumido infinito; $t_{95\%,df}$ é o valor da distribuição *t* para 95% de confiança para o número especificado de df.

Os modelos secundários foram ajustados no programa Microsoft Excel®. As equações dos modelos secundários foram realizadas em planilhas do Excel®.

4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MODELOS

Vários índices estatísticos foram utilizados para avaliar e comparar a qualidade do ajuste entre os valores observados e previstos dos modelos primários, como a soma da raiz média do erro quadrático (RMSE) (Equação 8) (MCKELLAR; LU; RATKOWSKY, 2003), fator bias (F_B) (Equação 9) (ROSS, 1996), fator de exatidão (F_E) (Equação 10) (ROSS, 1996) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) (Equação 11) (RAWLINGS; PANTULA; DICKEY, 2001). Enquanto o desempenho dos modelos secundários foi avaliado apenas pelo R^2 (Equação 12) (RATKOWSKY et al., 1982), obtido do ajuste dos modelos aos dados de $\mu_{máx}$ em função da temperatura de armazenamento.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (valor_{predito} - valor_{observado})^2}{n}} \quad (8)$$

$$fator\ bias = 10^{\left(\frac{\sum \log(valor_{predito}/valor_{observado})}{n}\right)} \quad (9)$$

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

$$R^2_{aj} = 1 - (1 - R^2) \frac{n - 1}{n - k - 1} \quad (11)$$

$$R^2 = \frac{\sum (valor_{predito} - valor_{observado\ médio})^2}{\sum (valor_{observado} - valor_{observado\ médio})^2} \quad (12)$$

Em que onde y_i é o i -ésimo valor da observação; \hat{y}_i é o i -ésimo valor da predição; k é o número de parâmetros; e n é o número de dados amostrais.

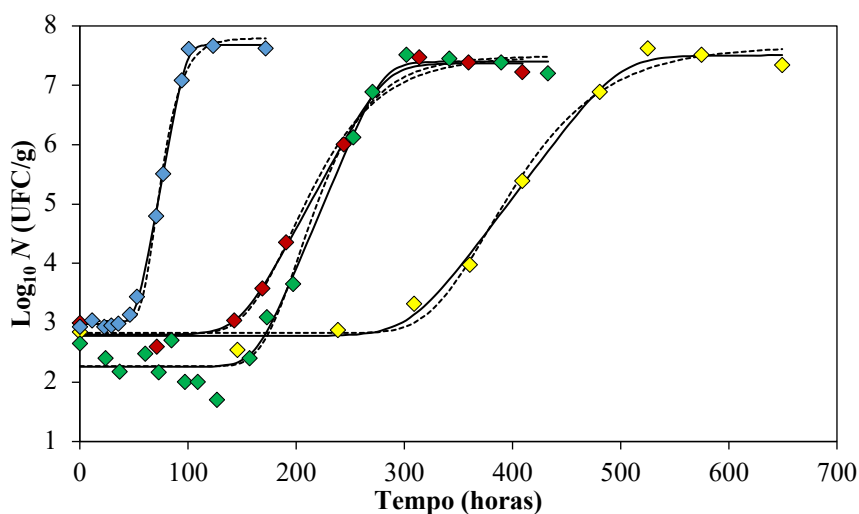
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo aqui relatado teve como objetivo caracterizar o crescimento de *C. botulinum* em purê de couve-flor em uma faixa de temperaturas de armazenamento de 5, 8, 10 e 16 °C. As temperaturas representaram possíveis condições de manuseio e armazenamento que um produto pronto para o consumo pode encontrar desde a embalagem até o mercado: 5 e 8 °C (refrigeração), 10 °C (refrigeração doméstica) e 16 °C (abuso de temperatura, por exemplo, interrupção da cadeia do frio em supermercados).

As curvas de crescimento foram obtidas em purê de couve-flor para avaliar a temperatura de incubação no crescimento de *C. botulinum*, e o modelo BAR e GOM foram ajustados aos dados experimentais utilizando o *software MicroRisk Lab*, como apresentado na (Figura 2).

Independente da temperatura de crescimento, as contagens iniciais obtidas foram, em média, de 2,8 log₁₀ UFC/g, indicando que as curvas de crescimento foram construídas partindo, aproximadamente, do mesmo ponto. De acordo com Lund e Peck (2000), vários surtos de origem alimentar foram causados após o consumo de alimentos à base de vegetais contaminados por *C. botulinum*, tanto em vegetais frescos, minimamente processados, quanto em vegetais processados termicamente.

Figura 2 - Curvas de crescimento de *Clostridium botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor e os ajustes do modelo de Baranyi e Roberts (linhas contínuas) e Gompertz (linhas tracejadas) aos dados experimentais nas temperaturas de 5 °C (símbolos amarelos), 8 °C (símbolos vermelhos), 10 °C (símbolos verdes) e 16 °C (símbolos azuis) de armazenamento.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Os parâmetros de crescimento calculados de *C. botulinum* incubado em purê de couve-flor nas temperaturas indicadas são mostrados na Tabela 1. *C. botulinum* foi capaz de crescer em todas as temperaturas, mesmo sob refrigeração (5 °C a 10 °C). O crescimento foi relativamente rápido na menor temperatura de armazenamento (5 °C), iniciando a fase exponencial em 12-13 dias, com uma velocidade específica máxima de crescimento de 0,06 e 0,07 h⁻¹ estimada pelo modelo de BAR e GOM, respectivamente.

Notermans, Dufrenne e Keijbets (1981) detectaram a presença de toxina de *C. botulinum* do Grupo II em batata embalada a vácuo após 9 dias de armazenamento a 10 °C. Enquanto Carlin e Peck (1996) verificaram o crescimento relativamente elevado (tempo de duplicação de 12 h) de *C. botulinum* do Grupo II em purê de cogumelo armazenado a 5 °C, já em purê de batata armazenado a 8 °C, os mesmos autores verificaram um tempo de duplicação de 10 h. Para os dados modelados nesta pesquisa utilizando o *software MicroRisk Lab*, o tempo de duplicação (geração) de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor armazenamento a 5 °C foi de, aproximadamente, 12,4 h, enquanto a 16 °C o tempo de duplicação foi de 3 h, considerando os dados de $\mu_{m\acute{a}x}$ estimados pelo modelo de BAR.

Tabela 1 - Parâmetros de crescimento (\pm DP) estimados pelo ajuste dos modelos de Baranyi e Roberts (BAR) e Gompertz (GOM) aos dados experimentais de *Clostridium botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor armazenado a 5 °C, 8 °C, 10 °C e 16 °C.

Temperatura (°C)	Modelo	Parâmetros e intervalos de confiança					
		$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	IC95%	t_{lag} (h)	IC95%	$y_{m\acute{a}x}$ (log ₁₀ UFC/g)	IC95%
5	BAR	0,06 ± 0,01	(0,04; 0,07)	304,50 ± 11,29	(276,87; 332,14)	7,51 ± 0,12	(7,21; 7,78)
	GOM	0,07 ± 0,01	(0,04; 0,02)	321,09 ± 13,50	(288,05; 354,12)	7,65 ± 0,22	(7,12; 8,19)
8	BAR	0,08 ± 0,01	(0,06; 0,10)	147,18 ± 7,08	(128,97; 165,39)	7,34 ± 0,10	(7,12; 7,65)
	GOM	0,09 ± 0,01	(0,06; 0,12)	151,99 ± 8,44	(130,31; 173,68)	7,48 ± 0,18	(7,03; 7,93)
10	BAR	0,10 ± 0,01	(0,08; 0,12)	161,92 ± 7,17	(146,55; 177,29)	7,34 ± 0,14	(7,10; 7,70)
	GOM	0,12 ± 0,02	(0,09; 0,16)	167,41 ± 7,04	(152,30; 182,51)	7,49 ± 0,19	(7,08; 7,89)
16	BAR	0,23 ± 0,01	(0,21; 0,25)	51,64 ± 1,03	(49,31; 53,97)	7,69 ± 0,05	(7,58; 7,80)
	GOM	0,23 ± 0,03	(0,22; 0,37)	56,69 ± 2,34	(51,40; 61,97)	7,79 ± 0,13	(7,51; 8,08)

IC95%: intervalo de confiança inferior e superior a 95%.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

De acordo com Choma et al. (2000), as flutuações de armazenamento antes do consumo do produto, ocorrendo mais frequentemente durante a distribuição do produto ou na geladeira dos consumidores, podem induzir o crescimento de micro-organismos patógenos, como *B. cereus* em

purês de vegetais pasteurizados, que foram capazes de crescer em temperaturas abaixo de 10 °C. Esse fato reforça a importância de estabelecimento e validação de modelos preditos para prever o crescimento de *C. botulinum* em purê de couve-flor em casos de interrupção da cadeia do frio, pois a cepa não proteolítica é capaz de crescer sob armazenamento abaixo de 3,0–3,3 °C.

Neste trabalho, o purê de couve-flor apresentou valor de pH de 5,56, de acordo com as informações obtidas dos dados de crescimento no *ComBase*. De acordo com Carlin e Peck (1996), a maioria dos vegetais cozidos em pH acima de 4,6 parece ser capaz de sustentar o crescimento e a produção de toxinas pelo *C. botulinum* proteolítico e não proteolítico, qualquer que seja o valor nutricional suposto. Carlin et al. (2000a) verificaram que o purê de brócolis inoculado com 10⁷ esporos/tubo de *C. botulinum* não proteolítico e submetido ao tratamento térmico de 80 °C por 10 min tornou-se a deterioração visível após 11 e 38 dias de armazenamento a 20 e 10 °C, respectivamente.

Ao observar os parâmetros da Tabela 1, é possível verificar que a temperatura é um fator importante no crescimento dos micro-organismos, com um aumento da velocidade específica máxima de crescimento e, conseqüentemente, diminuição do tempo da fase *lag*. Foi possível observar que os valores do parâmetro t_{lag} diminuíram com o aumento da temperatura, independentemente do modelo primário utilizado. Os valores variaram entre 51,64 h e 304,5 h para o modelo de BAR e entre 56,69 h e 321,09 h para o modelo de GOM. O contrário ocorreu com a velocidade de crescimento, em que foi possível observar um aumento em temperaturas mais elevadas, variando de 0,06 (h⁻¹) a 0,23 (h⁻¹) para o modelo de BAR e de 0,07 (h⁻¹) a 0,23 (h⁻¹) para o modelo de GOM, nas temperaturas de 5 °C a 16 °C, respectivamente. Assim, destaca-se a importância de manter toda a cadeia do frio, com a finalidade de aumentar o tempo da fase *lag* e de retardar ao máximo a fase exponencial de crescimento, evitando atingir valores críticos de patogenicidade.

As velocidades de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico observadas no estudo relatado aqui são úteis para futuros modelos de risco microbiano. No entanto, as velocidades de crescimento não podem ser usadas sozinhas para descrever o crescimento e/ou sobrevivência de patógenos em produtos, pois os modelos cinéticos de crescimento não levam em consideração o crescimento máximo ou a capacidade de carga de um micro-organismo em uma mercadoria (LI et al., 2013; VANDAMM et al., 2013).

Os parâmetros de crescimento obtidos pelos dois modelos apresentaram valores muito próximos, considerando os desvios-padrão e os intervalos de confiança a 95%. Além disso, os índices estatísticos (F_B , F_E e R^2_{aj}) obtidos dos ajustes dos modelos BAR e GOM (Tabela 2) indicam que ambos apresentaram um bom desempenho para descrever o crescimento de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor em todas as temperaturas avaliadas. Para avaliar modelos cinéticos

de crescimento para bactérias patogênicas: $0,95 < F_B < 1,11$ indicam um bom desempenho do modelo, com F_B entre 1,11 e 1,43 ou entre 0,87 e 0,95 correspondendo ao desempenho do modelo aceitável e $F_B < 0,87$ ou $> 1,43$ considerado como desempenho do modelo inaceitável (MEJLHOLM et al., 2010). Além disso, $F_E > 1,5$ indicam baixa precisão do modelo ou um desvio sistemático entre os valores de $\mu_{máx}$ observados e previstos (MEJLHOLM; DALGAARD, 2013).

No entanto, os valores do índice RMSE foram menores (mais próximos de zero) para o modelo de BAR, provando que esse modelo possui uma grande capacidade de ajuste às curvas de crescimento e é amplamente utilizado na literatura. Em uma busca recente, realizada em 01 de abril de 2022, indexados na *Scopus*, o modelo de BAR (BARANYI; ROBERTS, 1994) foi citado em 1851 trabalhos. Dentre esses, 184 foram publicados desde o ano de 2021 até o período atual (01 de abril de 2022).

Tabela 2 - Índices estatísticos de desempenho dos modelos Baranyi e Roberts (BAR) e Gompertz (GOM) ajustados aos dados experimentais de *Clostridium botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor armazenado a 5 °C, 8 °C, 10 °C e 16 °C.

Temperatura (°C)	Modelo	Índices estatísticos			
		RMSE (\log_{10} UFC/g)	F_B^*	F_E^*	$R^2_{aj}^*$
5	BAR	0,434	1,001	1,032	0,988
	GOM	0,588	1,001	1,036	0,987
8	BAR	0,369	1,001	1,024	0,995
	GOM	0,509	1,000	1,030	0,991
10	BAR	0,629	1,006	1,076	0,985
	GOM	0,700	1,006	1,082	0,983
16	BAR	0,165	1,000	1,012	0,998
	GOM	0,382	1,001	1,026	0,994

*Resultado não mostrado no *MicroRisk Lab*.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

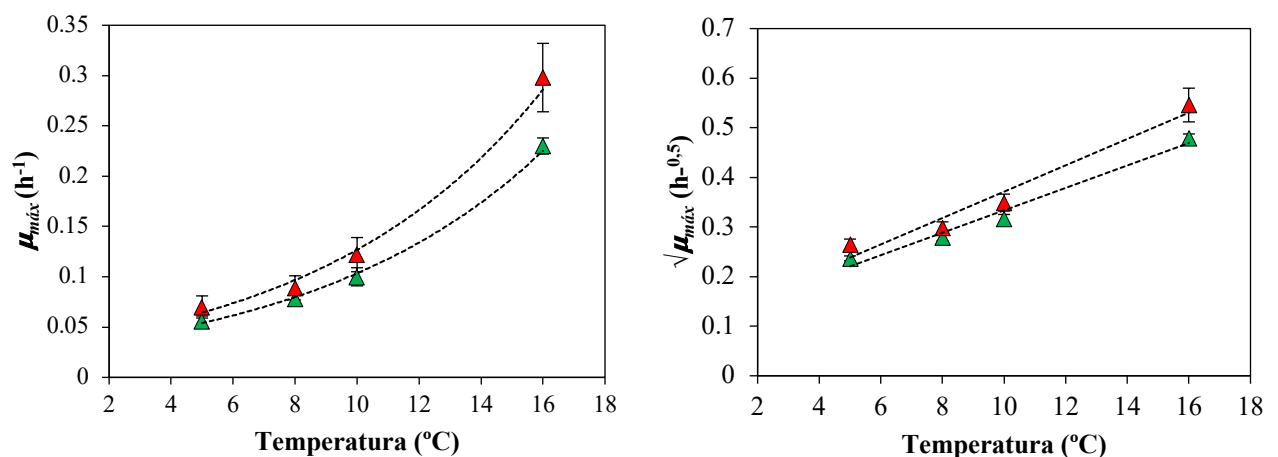
As formas purê de frutas e hortaliças podem ser utilizadas como principais ingredientes alimentares para consumo imediato, como alimentos para bebês ou idosos que possuem maior valor de mercado pela praticidade e conforto em relação aos produtos frescos deles. Em geral, os alimentos pré-embalados processados destinam-se a fornecer produtos seguros, nutritivos e de alta qualidade (HOLDSWORTH; SIMPSON, 2016).

Um extenso modelo de crescimento e limite de crescimento para *C. botulinum* não proteolítico foi desenvolvido recentemente (KOUKO et al., 2021). Esse modelo incluiu o efeito da temperatura,

NaCl/*aw*, pH, ácidos acético, benzoico, cítrico, láctico e sórbico e seu efeito interativo e foi validado com sucesso para produtos de aves e frutos do mar embalados a vácuo. No entanto, modelos preditivos validados para o crescimento de *C. botulinum* não proteolítico em produtos vegetais, como os purês de vegetais, são escassos na literatura. Embora a alta prevalência dessa cepa tenha sido relatada para alguns produtos vegetais, onde a ocorrência de diferentes tipos de neurotoxinas dependeu das regiões geográficas (PECK et al., 2008).

Os modelos secundários se ajustaram bem aos dados do parâmetro $\mu_{\text{máx}}$ obtidos pelos modelos BAR e GOM ajustados os dados de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor. Os ajustes dos modelos secundários estão apresentados na Figura 3 e as equações dos modelos com seus parâmetros ajustados estão apresentados na Tabela 3.

Figura 3 - Modelos secundários que representam o efeito da temperatura no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de *Clostridium botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor. (A) modelo exponencial e (B) modelo da raiz quadrada. Os dados representam a velocidade específica máxima de crescimento obtida pelo modelo de Baranyi e Roberts (dados verdes) e pelo modelo de Gompertz (dados vermelhos). As linhas tracejadas representam os ajustes os modelos secundários aos dados.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Ao analisar a Figura 3, é possível verificar, de forma qualitativa, que os modelos apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, sendo que os modelos secundários apresentados na Tabela 3 podem ser usados para prever a velocidade específica máxima de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor, nas condições estudadas e em condições que não extrapolem as temperaturas no intervalo entre 5 $^{\circ}\text{C}$ e 16 $^{\circ}\text{C}$. Para isso, um modelo preditivo precisa ser validado, a

partir de simulações do crescimento desse micro-organismo em condições de oscilação de temperatura de armazenamento. Assim, a aplicação de modelos preditivos e *software* de fácil utilização podem auxiliar na identificação de patógenos contaminantes de alimentos em diferentes condições de armazenamento, sem a necessidade de realização de vários experimentos para determinar a segurança do produto. Além disso, os modelos podem ser utilizados para a tomada de decisão nas indústrias de vegetais, como verificar a eficiência de diferentes valores de pH, NaCl/*aw* e ácidos na conservação dos alimentos, no desenvolvimento de novas formulações de alimentos, novas embalagens para o aumento da vida útil de alimentos, entre outras aplicações.

Tabela 3 - Equações dos modelos secundários que representam a influência da temperatura no parâmetro velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) de *Clostridium botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor.

Modelo primário	Modelo secundário	Equação	R ²
BAR	Exponencial	$\mu_{máx} = 0,0283 \times e^{0,1296 \cdot T}$	0,999
	Raiz quadrada	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,027 (T + 3,97)$	0,962
GOM	Exponencial	$\mu_{máx} = 0,0327 \times e^{0,1355 \cdot T}$	0,995
	Raiz quadrada	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,023 (T + 4,76)$	0,978

Fonte: elaborada pela autora (2022).

6. CONCLUSÃO

Os modelos primários de Baranyi e Roberts e Gompertz apresentaram um bom desempenho para descrever o crescimento do *Clostridium botulinum* não proteolítico em purê de couve-flor. Além disso, os modelos secundários descreveram bem a influência da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento *C. botulinum*, com destaque para o modelo Exponencial.

Em conclusão, *C. botulinum* foi capaz de crescer em purê de couve-flor mantido em uma faixa de temperatura, com associação positiva entre a velocidade de crescimento e a temperatura. Assim, purês de vegetais, como a couve-flor, podem ser mantidos em temperaturas mais baixas para minimizar o potencial de crescimento de *C. botulinum* não proteolítico. Embora os eventos de contaminação do produto sejam esporádicos, a aplicação de modelos preditivos e *softwares* de fácil utilização, como o *MicroRisk*, podem auxiliar a indústria de produtos vegetais para estudos futuros na determinação da vida útil de alimentos, sem a necessidade de realização de vários experimentos para determinar a segurança dos produtos, especialmente em temperaturas elevadas ou em armazenamento prolongado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACMSF (ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD) **Report on Vacuum Packaging and Associated Processes**, London, HMSO, 1992.

ALBANESE, D. et al. Physical and chemical changes in minimally processed green asparagus during cold-storage. **Food Chemistry**, v. 101, p. 274–280, 2007.

AUGUSTIN, M. A. et al. Role of food processing in food and nutrition security. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 115–125, 2016.

BAHÇEÇI, K. S. et al. Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: Change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 187–192, 2005.

BARANYI, J.; BUSS. The use of predictive models to optimize risk of decisions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 19–23, 2017.

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

BATES, R. P.; MORRIS, J. R.; CRANDALL, P. G. Principles and practices of small-and medium-scale fruit juice processing. **Food & Agriculture Org**, n. 146, 2001.

BIGELOW, W. D. ESTY, J. R. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 602-617, 1920.

BIGELOW, W. D. The logarithmic nature of thermal death time curves. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 528-536, 1921.

BRACONNIER, A. Recherche de *Clostridium botulinum* dans des plats cuisinés et étude de sa croissance dans des substrats à base de légumes, Thèse d'Université. Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille, France, 2001.

BUCHANAN, R. L. Predictive food microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, p. 6-11, 1993.

CARLIN, F. et al. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. **International Journal of Food Microbiology**, p. 60, p. 117–35, 2000a.

CARLIN, F. et al. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purées. **Food Microbiology**, v. 17, p. 153–65, 2000b.

CARLIN, F. **Safety of cooked chilled foods containing vegetables**. Editor(s): Wim Jongen, in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Fruit and Vegetable Processing, Woodhead Publishing, p. 215-230, 2002.

CARLIN, F.; PECK, M. W. Growth and toxin production by non-proteolytic and proteolytic *Clostridium botulinum* in cooked vegetables. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 152–6, 1995.

CARLIN, F.; PECK, M. W. Growth of and toxin production by nonproteolytic botulinum in cooked puried vegetales at refrigeration temperatures. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 8, p. 3069-3072, 1996.

CARVALHO, L. et al. Toxinas biológicas como potenciais armas biológicas- características e métodos diagnósticos. **Revista Portuguesa de doenças infecciosas**, v. 14, n. 2, p. 69-75, 2018.

CASEMIRO, I. P.; ZAMBIAZI, R. C.; VENDRAMINE, A. L. A. Sous-vide: aplicações e qualidade de vegetais. **Revista alimento, ciência, tecnologia e meio ambiente**, v. 1, n. 1, p. 70-82, 2020.

CHOMA, C. et al. Prevalence, characterisation and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 617–25, 2000.

DANNENHAUER, C. E. **Desenvolvimento de um Aplicativo Computacional para Microbiologia Preditiva**. 2010. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimento) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ESPOLO, C. R. et al. **Práticas em tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2015.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R. M.; MANNAN, K. S. B. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science, Bangladesh**, v. 40, n. 2, p. 121-131, 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GARRE, A. et al. Bioinactivation FE: A free web application for modelling static and dynamic microbial inactivation. **Food Research International**, v. 112, p. 353–360, 2018.

GUINEBRETIERE, M-H. et al. Identification of bacteria in pasteurized courgette purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4520–30, 2001.

HOLDSWORTH, S. D.; SIMPSON, R. Thermal processing of packaged foods. (3rd ed.), Springer, New York, NY, 2016.

IBGE. Censo agropecuário. 2017. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm>>. Acesso em: 05 mar. 2022.

ICMSF. Micro-organisms in Foods. 5. **Microbiological Specifications of Food Pathogens**, London, Blackie Academic and Professional, 1996.

JUNEJA, V. K. et al. A predictive growth model for *Clostridium botulinum* during cooling of cooked uncured ground beef. **Food Microbiology**, v. 93, n. 8, 2021. Article 103618. (Available online).

KALISZ, A. et al. Mineral composition of cauliflowers with differently coloured curds modified by the chilling of juvenile plants. **Scientia Horticulturae**, v. 232, n. 1, p. 216–225, 2018.

KETCHAM, E. M.; GOMEZ, H. F. Infant botulism: a diagnostic and management challenge pediatric perspective. **Air Medical Journal**, Orlando, v. 22, n. 5, p. 6-11, 2003.

KORUS, A. Effect of preliminary and technological treatments on the content of chlorophylls and carotenoids in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 335–344, 2013.

KOUKOU, I; MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Cardinal parameter growth and growth boundary model for non-proteolytic *Clostridium botulinum* – effect of eight environmental factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 346, p. 109-162, 2021.

LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M. Método de conservação de alimentos. **Revista saúde em foco**, v. 1, n. 10, p. 51-62, 2018.

LI, D. et al. Development and validation of a mathematical model for growth of pathogens in cut melons. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 953-958, 2013.

LIU, Y. et al. Microrisk Lab: An Online Freeware for Predictive Microbiology. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 18, n. 8, p. 607-615, 2021.

LUND, B. M.; PECK, M. W. *Clostridium botulinum* in The Microbiological Quality and Safety of Food. Volume II, eds Lund B M, Baird-Parker A C and Gould G W, Gaithersburg, Aspen Publishers, p. 1057–109, 2000.

MCKELLAR, R.; LU, X.; RATKOWSKY, D. A. Model fitting and uncertainty. In: R. McKellar, & X. Lu (Eds.), **Modeling Microbial Responses in Foods** (p. 151-196). Boca Raton: CRC Press, 2003.

MEJLHOLM, O. et al. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* - an international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 137-150, 2010.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for psychrotolerant *Lactobacillus* spp. in seafood and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 244-260, 2013.

MELO, R. A. C. et al. **Caracterização e diagnóstico da cadeia produtiva de brássicas nas principais regiões produtoras brasileiras** Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2017. 100p. (Documentos, 157).

NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. **Fresh and processed vegetables, in The Microbiological Quality and Safety of Food**, eds Lund B M, Baird-Parker A C and Gould G W, Gaithersburg, Aspen Publishers, p. 620–84, 2000.

NOTERMANS, S. H. W. **Control in fruits and vegetables, in *Clostridium botulinum*; Ecology and control in foods**, eds Hauschild A H Wand Dodds K L, New York, Marcel Dekker, p. 233–60, 1993.

NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; KEIJBETS, M. J. H. Vacuum-packed cooked potatoes: toxin production by *Clostridium botulinum* and shelf-life. **Journal of Food Protection**, v. 44, p. 572–5, 1981.

PECK, M. W. *Clostridium botulinum* and the safety of refrigerated processed foods of extended durability. **Trends Food Sci Technol**, v. 8, p. 186–92, 1997.

PECK, M. W. et al. Assessment of the potential for growth and toxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in commercial chilled foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 207–216, 2008.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A. Predictive microbiology in foods. Nova Iorque: Springer, 2013. 128 p.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos** Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002. 1737p.

RATKOWSKY, D. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 1–5, 1982.

RAWLINGS, J. O.; PANTULA, S. G.; DICKEY, D. A. Chapter 7 Model development variable selection. In: Applied regression analysis: a research tool (pp.205-234). **Springer Science & Business Media**, p. 205-234, 2001.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal Applied Bacteriology**, v. 81, p. 501–508, 1996.

SARAIVA, M. et al. Sequenciação de estirpes do *Clostridium botulinum* tipo B isoladas em Portugal. **Revista portuguesa de doenças infecciosas**, v. 10, n. 9, p. 41-46. 2018.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M. Patógenos emergentes relacionados á contaminação de alimentos de origem animal. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 123-127, 2002.

SCHLEI, K. P. et al. Microbiologia preditiva: aspectos gerais e tendências. **Revista Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 52-68, 2018.

SOUZA, C. P. Vigilância em saúde e prevenção na transmissão de patógenos. **Revista de Cultura e Extensão**, v. 11, n. 2, p. 60-72, 2014.

SPINIA, R. G. et al. Invaginación intestinal en un lactante con diagnóstico de botulismo. Reporte de un caso. **Arch Argent Pediatr**, v. 113, n. 5, p. 286-289. Maio, 2015.

STRINGER S. C.; FERNANDES M. A.; METRIS A. **Safety of Sous-Vide Foods: Feasibility of Extending Combase to Describe the Growth/Survival/Death Response of Bacterial Foodborne Pathogens between 40 °C and 60 °C**. Foods Standards Agency; London, UK: 2012. Institute of Food Research Report for Foods Standards Agency.

USDA. Overview of predictive microbiology. **Predictive Microbiology Information Portal**, 2016.

VANDAMM, J. P. et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. **Food Microbiology**, v. 34, p. 151-157, 2013.

VIANA, M. C. P.; SANTOS, J. S.; VIANA, P. T. Epidemiologia e fatores de risco relacionados á intoxicação alimentar causada por *Clostridium botulinum*: uma revisão narrativa. **Revista Clinical & Biomedical Research**, v. 39, n. 2, p. 160-170, 2019.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875, 1990.