

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA**

**AGATHA DE MELO**

GRR: 20137524

**ELIAS SANTIAGO DINIZ**

GRR: 20135636

**NATHALIE DO AMARAL PORTO MARTINS**

GRR: 20137583

**RELATÓRIO DE ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE ALICYCLOBACILLUS  
ACIDOTERRESTRIS CRA 7152 EM SUCO DE MAÇÃ.**

Base de dados – *Journal of Food Processing and Preservation*

**CURITIBA  
2017**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Alicyclobacillus Acidoterrestris</i> .....	5
2.2 Meio de quantificação K e de esporulação.....	5
2.3 Preparo da suspensão de esporos.....	5
2.4 Método estatístico .....	5
<b>3 OBJETIVO, RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>6</b>
3.1 Objetivo .....	6
3.2 Resultados e discussões .....	6
3.3 Análise de resíduos .....	9
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>10</b>

## RESUMO

O controle de crescimento da bactéria *Alicyclobacillus* é de suma importância na indústria de sucos, pois a mesma causa deterioração dos produtos, causando assim prejuízos para as empresas. A base de dados utilizada é do artigo "Modeling the Growth Limit of *Alicyclobacillus Acidoterrestris* CRA7152 in Apple Juice: Effect of pH, Brix, Temperature, and Nisin Concentration," dos autores W.E.L. Pena, P.R. De Massaguer, A.D.G. Zuniga, and S.H. Saraiva (2011), e conta com uma amostra composta de 74 observações, além das variáveis Brix, Ph, Nisina e Temperatura com o objetivo de determinar a presença ou ausência de crescimento da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maçã. O método estatístico utilizado foi o de Regressão Linear generalizada com família Binomial e função de ligação Logito. Observou-se que as variáveis PH e Temperatura têm relação positiva com o crescimento da bactéria enquanto as variáveis Brix e Nisina possuem relação negativa.

**Palavras-chave:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, suco de maçã, modelagem, nisina.

## 1 INTRODUÇÃO

A pasteurização é um processo de esterilização de alimentos (facilmente perecíveis) que consiste em submetê-los a uma temperatura abaixo do seu ponto de ebulição e em seguida a resfriamento súbito, com a finalidade de eliminar determinados microrganismos nocivos (BARROS; PANETTA; PERCES, 1984).

A bactéria *Alicyclobacillus* forma esporos capazes de crescer em condições ácidas e de sobreviver a procedimentos típicos de pasteurização, o que é um problema uma vez que a germinação e crescimento dos esporos causa contaminação dos alimentos (PEÑA et al, 2010). Em geral essa bactéria está associada a produção de sucos de frutas industrializados, os produtos contaminados desenvolvem um odor e / ou sabor de desinfetante (devido à produção de guaiacol), mas as bactérias não causam inchaço da embalagem ou descoloração do produto e também não são patogênicas para seres humanos (ALBERICE, 2009).

A indústria de conservas trabalha sob o pressuposto de que os esporos bacterianos não germinam a valores de pH inferiores a 4,6, e que os organismos tolerantes a ácidos não são muito resistentes ao calor. Neste caso, é aplicável um processo de pasteurização de calor baixo (ALBERICE, 2009).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Para cultivo, utilizou-se uma cepa (CRA 7152) de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. A metodologia utilizada neste trabalho foi realizada por Peña et al, 2010. E foram observados 74 dados.

### 2.2 MEIO DE QUANTIFICAÇÃO K E DE ESPORULAÇÃO

O meio de quantificação K consistiu de: peptona 5 g ; glicose 1 g ; Tween-80 1 g ; extrato de levedura 2,5 g ; ágar 15 g e 1 L de água destilada. O meio foi autoclavado (121°C, 15 min), e o pH foi ajustado para 3,7 com ácido málico a 25%.

O meio de esporulação (AAM) consistiu de:  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0,05%; 1,5% de ágar; 1,0 g de extrato de levedura ; 0,2 g  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,25 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,6 g de  $KH_2PO_4$ , 1 g de glicose e 1 L de água. O pH foi ajustado para 4,0.

### 2.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

Analisou-se o crescimento de células de *A. Acidoterrestris* através de tubos inclinados contendo meio PDA, pH 5,6, incubados a 44°C durante 3 dias. A suspensão produzida (0,1 mL) foi inoculada em 100 garrafas de vidro (290 mL) contendo 60 mL de meio sólido e inclinado (AAM) e incubados durante 9 dias a 45°C. Após a 90% de esporulação ter sido confirmada por microscopia, coletou-se os esporos, os quais foram lavados e ressuspensos em água destilada após três centrifugações (12,310 g; 15 min; 4°C). Lisozima ( $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi adicionada, após o ajuste do pH para 11, para a interrupção das células vegetativas. A suspensão de esporos foi armazenada a 4°C em água destilada até sua utilização. A contagem de esporos foi realizada em meio K após a ativação térmica durante 10 min a 80°C. As placas invertidas foram incubadas a 43 ° C durante 5 dias. A suspensão de concentração de esporos foi de  $8 \cdot 10^8$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ .

### 2.4 MÉTODO ESTATÍSTICO

Para análise, utilizou-se o *software* estatístico R®, e o método estatístico utilizado foi o de Modelo Linear Generalizado, com família Binomial e função de ligação Logito .

### 3 OBJETIVO, RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 OBJETIVO

Foi realizada uma análise estatística a fim de determinar a presença ou ausência de crescimento da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maçã, para isso foram considerados os seguintes fatores:

- **PH - Variando de 3,5 a 5,5**

(representação da escala na qual uma solução neutra é igual a sete, os valores menores que sete indicam uma solução ácida e os maiores que sete indicam uma solução básica.)

- **BRIX - Variando de 11 a 19**

(valor de controle de qualidade que mede a porcentagem de sólidos solúveis totais em sucos cítricos)

- **CONCENTRAÇÃO DE NISINA - Variando de 0 - 70**

(conservante natural para alimentos)

- **TEMPERATURA - Variando de 25°C a 50°C**

#### 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi feita uma breve análise exploratória dos dados utilizando a função Summary, mostrando os valores mínimos, médios e máximos das variáveis explicativas, PH, Nisina, Temperatura e Brix.

(Tabela 1 - Apresentando alguns valores do Summary dos fatores estudados)

	<b>PH</b>	<b>Nisina</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Brix</b>
<b>Mínimo</b>	3,500	0,000	25,00	11,00
<b>1º Quartil</b>	4,000	0,000	35,00	11,00
<b>Mediana</b>	4,000	30,00	43,00	13,00
<b>Média</b>	4,486	35,14	38,38	14,24
<b>3º Quartil</b>	5,000	50,00	43,00	15,00
<b>Máximo</b>	5,500	70,00	50,00	19,00

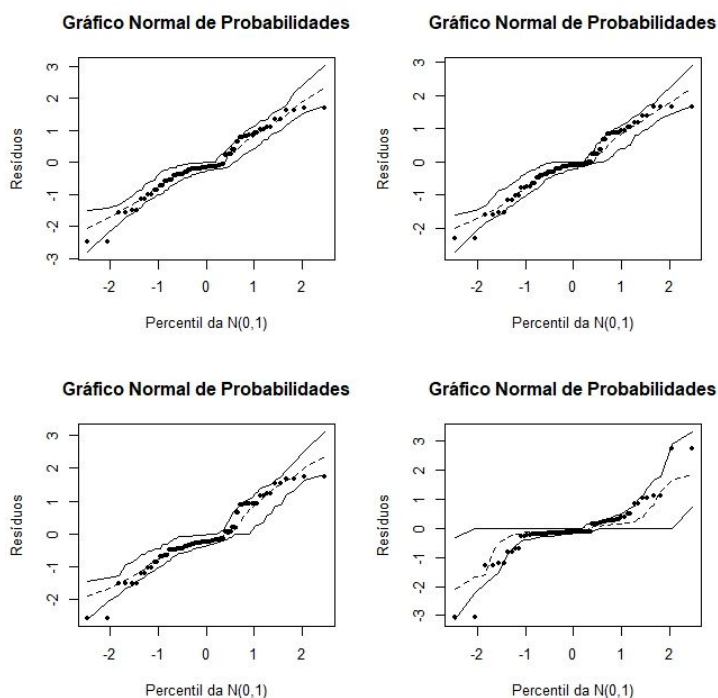
Em seguida foram ajustados 4 modelos de regressão linear generalizados (Tabela 1), todas usando família binomial porém cada um dos 4 modelos foi ajustado com uma função de ligação diferente; Logito, Probit, ClogLog e Cauchy.

(Tabela 1 - Valores de AIC dos modelos ajustados)

Ajuste	AIC	LogLik
Logito	62.33065	-26.16533
Probit	62.01991	-26.00995
ClogLog	65.16154	-27.58077
Cauchy	55.77467	-22.88734

Após análise estatística, considerando o índice de Akaike (AIC) e convergência dos modelos, foi observado que os modelos com função de ligação Cauchy e ClogLog não convergem portanto foram descartados. Os modelos da função Logito e Probit, tiveram valores próximos de AIC, nisso optamos a trabalhar com a função Logito. Segue abaixo os gráficos com envelope simulado (Figura 2) dos modelos que foram feitos.

(Figura 2 - Gráficos normal de probabilidade dos modelos ajustados)



Determinado o modelo que será utilizado, foi feito um resumo de resultados do mesmo (Quadro 1)

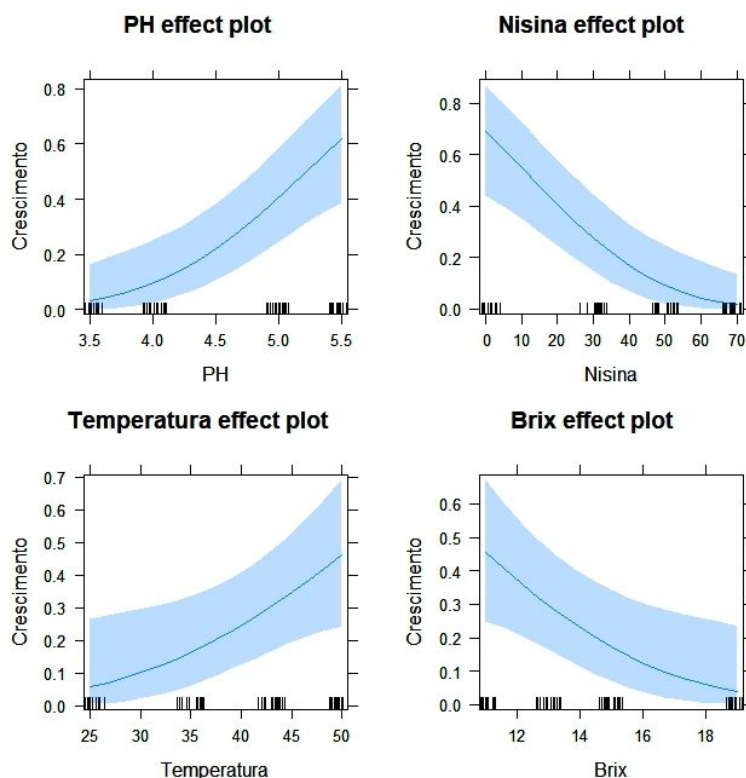
(Quadro 1 - Summary do modelo adequado)

Coefficients:	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z )
(Intercept)	-7.24633	3.21864	-2.251	0.024362 *
PH	1.88595		0.54123	3.485 0.000493 ***
Nisina	-0.06628	0.01905	-3.479	0.000503 ***
Temperatura	0.11042	0.04769	2.316	0.020585 *
Brix	-0.31173	0.14317	-2.177	0.029458 *

Signif. codes:  
0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Para uma análise com 95% de confiança todas as variáveis tiveram efeito significativo, como mostra o Quadro 1, portanto mantivemos todas elas no modelo.

(Figura 3 - Relação entre Crescimento e as demais variáveis)



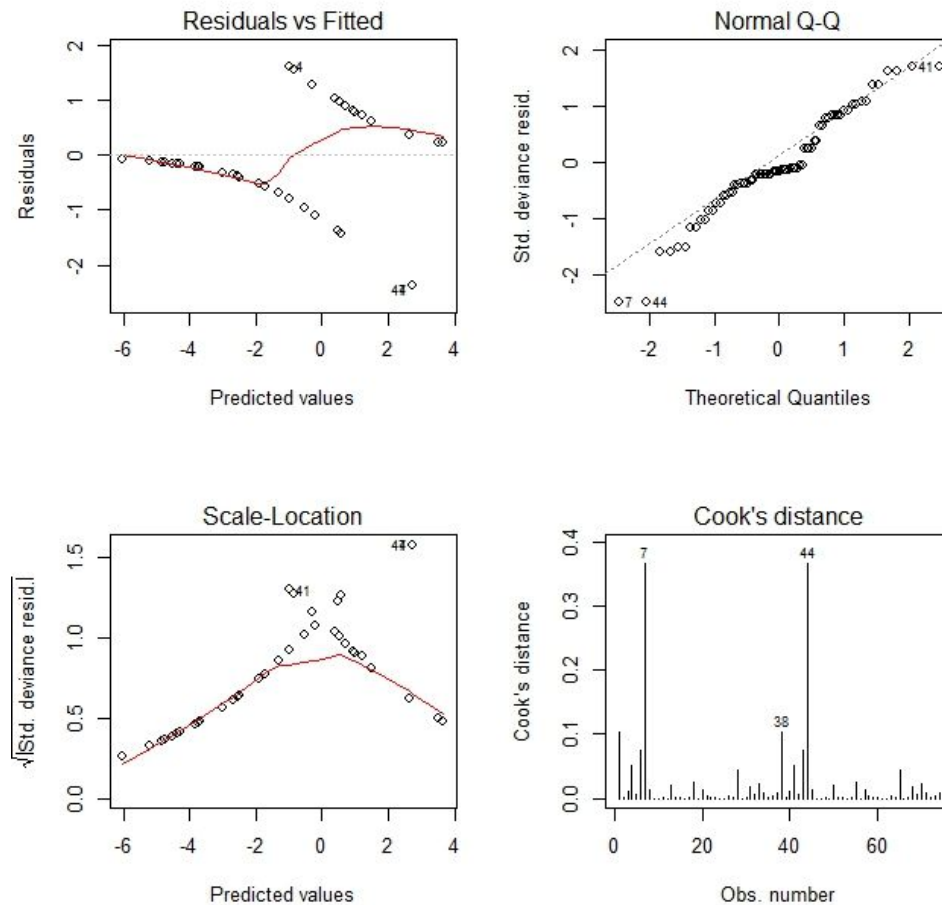
A Figura 3 reforça os resultados do Quadro 1, mostrando que as variáveis Brix e Nisina têm uma relação negativa com o Crescimento enquanto as variáveis PH e Temperatura têm uma relação positiva com o Crescimento da Bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris*.



### 3.3 ANÁLISE DE RESÍDUOS

Através da análise resíduos dos dados originais, foi observado que os pontos 7 e 44 se destacam dos demais como pode ser observado no na Figura 3.

(Figura 3 - Análise de resíduos)



Olhando novamente os dados descobrimos que os dados 7 e 44 apresentam valores máximos para PH (5,5), para Tempo (50°C) e para Brix (19) porém ambos apresentam valor mínimo para Nisina (0) além de não apresentar crescimento da bactéria.

Com isso foi feita uma nova análise retirando essas duas observações do modelo, e percebemos que elas não tiveram influência nas estimativas dentro do modelos, com isso optamos por mantê las no modelo.

## 4 CONCLUSÕES

Foi observado que as variáveis Temperatura e PH têm relação positiva com o crescimento da bactéria:

Para cada 1 unidade a mais de PH a chance da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* crescer no suco fica multiplicada por 6,59.

Para cada 1 unidade a mais de Temperatura a chance da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* crescer no suco fica multiplicada por 1,12.

Também foi observado que as variáveis Nisina e Brix têm relação negativa com o crescimento da bactéria:

Para cada 1 unidade a mais de Nisina a chance da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* não crescer no suco fica multiplicada por 0,93.

Para cada 1 unidade a mais de Brix a chance da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* não crescer no suco fica multiplicada por 0,73.

Foi observado que as observações 7 e 44 se destacavam da demais, com isso foi feita uma análise das mesmas para investigar se a ausência das mesmas afetaria o modelo, porém percebemos que não houve influência dentro do modelo e optou-se por mantê-la no modelo.

## REFERÊNCIAS

ALBERICE, J. V. **Inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por saponinas e detecção por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR)**. Dissertação. Instituto de Química de São Paulo. Universidade de São Paulo, 100f., 2009.

BARROS, V. R. M.; PANETTA, J. C.; PERCES, E. M. C. Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite da capital de São Paulo - Brasil. **Higiene Alimentar**. v. 3, p. 199-207, 1984.

PEÑA, W. E. L.; MASSAGUER, P. R.; ZUÑIGA, A. D. G.; SARAIVA, S. H. Modeling the growth limit of ***Alicyclobacillus acidoterrestres* CRA7152** in apple juice: effect of pH, brix, temperature and nisin concentration. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 35, p. 509-517, 2010.