

Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos

# VERÔNICA ORTIZ ALVARENGA

"Resistência de esporos de *Bacillus cereus* ao processo de secagem do leite por atomização"

*"Bacillus cereus* spore resistance to the spray drying process for milk powder yield"

CAMPINAS 2017

## VERÔNICA ORTIZ ALVARENGA

# "Resistência de esporos de *Bacillus cereus* ao processo de secagem do leite em *spray drying*"

# *"Bacillus cereus* spore resistance to the spray drying process for milk powder yield"

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in the área of Food Science

#### Orientador: PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE Á VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VERÔNICA ORTIZ ALVARENGA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA.

#### PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

CAMPINAS

2017

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Alvarenga, Verônica Ortiz, 1983 AL86r Resistência de esporos de *Bacillus cereus* ao processo de secagem por atomização / Verônica Ortiz Alvarenga. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Heterogeneidade. 2. Microbiologia quantitativa. 3. Estresse subletal. 4. Patógenos. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Bacillus cereus spore resistance to the spray drying process for milk powder yield Palavras-chave em inglês: Heterogeneity Quantitative microbiology Sublethal stress Pathogens Área de concentração: Ciência de Alimentos Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos Banca examinadora: Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador] Pedro Esteves Duarte Augusto Uelinton Manoel Pinto Louise Emy Kurozawa Carlos Humberto Corassin Data de defesa: 14-09-2017 Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana Orientador FEA/ Unicamp

## Prof. Dr. Pedro Esteves Duarte Augusto Membro ESALQ/USP

Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto Membro FCF/USP

Prof. Dra. Louise Emy Kurozawa Membro FEA/Unicamp

Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin Membro FZEA/USP

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

"A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o mundo."

Albert Einstein

## DEDICATÓRIA

À memória da minha querida avó Izabel Cristina pelos seus ensinamentos que fizeram, fazem e sempre farão parte de minha vida.

#### AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar-me sempre.

Aos meus pais por acreditarem e incentivarem os meus sonhos. À vocês não tenho palavras para expressar minha admiração e minha gratidão!

Aos meus irmãos, Neto e Ana Luísa, pelo incentivo e pelo apoio irrestrito. Vocês são parte desta conquista!

Ao meu afilhado, Heitor, por todos os sorrisos recebidos. Muito obrigada!

Ao meu namorado, Marcos, pela paciência, cumplicidade e fé. Você foi essencial durante a elaboração dessa tese. À você devo parte desta conquista!

Ao meu orientador e amigo de longa data não tenho palavras para agradecer pela oportunidade e confiança em mim depositadas. À você, Anderson, devo parte desta conquista e da minha formação profissional. Muito obrigada!

Aos meus amigos Bruna e Leo, muito obrigada por tornarem leves e divertidos o período do doutorado. Muito obrigada!

Aos meus amigos Gerson, Humberto, Nathália e Tânia, pelos anos de convivência, amizade e companheirismo. À vocês, muito obrigada!

Á Fernanda, pelas valiosas sugestões na fase de elaboração da tese. Muito obrigada!

Ao Arthur, a Deboráh, a Lívia e Rosi pelos valiosos auxílios nos experimentos. Sem vocês este trabalho não teria sido concluído. Muito obrigada!

Ao Eric, pela ajuda, incentivo e as longas conversas. Muito obrigada!

A Profa. Dra. Miriam Hubinger pelo empréstimo do Spray Dryer.

A Vanessa pelo auxílio durante as análises.

Aos colegas do LMQA, muito obrigada pelo período de convivência!

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

A Capes e ao Faepex pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca examinadora. À vocês agradeço as valiosas sugestões que contribuiriam para a melhoria deste trabalho.

#### **RESUMO**

Bacillus cereus destaca-se como um micro-organismo patogênico esporulado cuja prevalência em leite e derivados pode ser elevada. Esse micro-organismo é uma preocupação para a indústria de produtos lácteos, pela resistência química e física de seus esporos, e pela capacidade deteriorante e potencial patogênico de diferentes cepas. O processo de secagem por atomização é amplamente utilizado na indústria de laticínios para obtenção de leite em pó, dentre outros produtos. Apesar de não ser aplicado com o objetivo de causar inativação microbiana, no processo secagem por atomização, temperaturas de entrada e saída de ar de até 250 °C e aproximadamente 110°C, respectivamente, podem aplicadas para produção de leite e produtos lácteos em pó. Apesar de drásticas, devido à concomitante redução da atividade de água, não foram encontrados relatos sob a inativação de esporos de B. cereus em processos de secagem por atomização. Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho foi quantificar o impacto de processos de secagem por atomização em esporos de B. cereus submetidos ou não a condições de estresse subletal antes da secagem. Para isso, primeiramente se avaliou a sobrevivência de 12 cepas de B. cereus a secagem por atomização em diferentes condições de temperatura de entrada de ar, totalizando 114 experimentos independentes. Posteriormente, avaliou-se o efeito da matriz (em leite integral, suspensão de talco e tampão fosfato salino (PBS)) na resistência térmica de três cepas de B. cereus usando-se tubos capilares, totalizando 27 condições independentes. As condições testadas em tubo capilar tiveram por objetivo determinar a matriz que seria utilizada para comparação da sobrevivência de esporos de B. cereus na secagem por atomização. Também se avaliou a tolerância de B. cereus induzida por processos de estresse térmico subletais aplicados antes do processo de secagem. Um total de quatro condições de estresse sub-letal foram avaliados: tratamentos 1, 2 e 3 foram aplicados choques de calor a diferentes temperaturas (80 °C e 90 °C) com variação nos tempos de exposição de 10 a 30 min; e no tratamento 4 houve a combinação de choque de calor (72 °C/15 s), choque frio a 4 °C/12 h e novo choque de calor a 72 °C/15 s. Os resultados foram expressos em termos de número de reduções decimais ( $\gamma$ ) causado pelo processo de secagem por atomização. Os experimentos conduzidos no capítulo 2 permitiram concluir que os valores de  $\gamma$  variaram de 1,1 a 4,7, com um elevado coeficiente de variação (CV) de 46,1% entre as cepas submetidas aos processos de secagem. Adicionalmente, foi realizada uma análise comparativa do proteoma entre duas cepas (uma sensível (540) e uma resistente (436) ao processo de secagem por atomização), sendo observada uma diferença na densidade de proteínas que serão posteriormente identificadas. Os valores D em tubos capilares variaram em até 3 vezes entre as condições e as cepas estudadas. Os valores z obtidos usando tubos capilares e os coeficientes térmicos determinados para o processo de secagem não devem ser comparados e/ou extrapolados, pois são processos com características distintas A aplicação dos tratamentos subletais diminuiu o y das cepas B63 e 540 ao processo de secagem por atomização e a sua persistência nas amostras produzidas após o período de estocagem. As populações de esporos submetidas aos 4 tratamentos foram determinadas após 180 dias de estocagem e variaram entre < 1,0 a 4,4 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca. Os resultados demonstram que, apesar de não ser um tratamento aplicado ao leite com objetivo de inativar micro-organismos, o processo de secagem por atomização pode causar até 4,7 reduções decimais em esporos de B. cereus. O número de reduções causados é dependente de cepa, do substrato e temperatura do ar de secagem. Além disso, a exposição de cepas de B. cereus a condições de estresse sub-letal, leva a uma diminuição do número de reduções decimais causados pelo processo de secagem por atomização em até 5 vezes O presente estudo contribui para o entendimento do impacto da secagem por atomização sobre esporos B. cereus em leite. Este entendimento é de suma importância, pois permite a gestão moderna da segurança dos alimentos. A partir do conhecimento do número de reduções decimais causados pela secagem por atomização sobre esporos de B. cereus em leite, o produtor de leite em pó pode estabelecer medidas de controle mais estritas nas etapas de pré-processamento (ordenha e transporte do leite) visando-se, por exemplo, atender padrões ou especificações microbiológicas. Já a indústria de alimentos, que usa o leite em pó como matéria-prima para formulação de diversos produtos, pode utilizar estes dados no desenho de processos térmicos visando-se obter alimentos seguros e estáveis do ponto de vista microbiológico.

Palavras-chave: heterogeneidade, microbiologia quantitativa, estresse subletal, patógeno

#### ABSTRACT

Bacillus cereus is a pathogenic sporeforming bacteria which is found with high prevalence in milk and other dairy products. This microorganism is of great concern to dairy industry. The pathogenic potential of different strains, its capacity to spoilage the product and the spore resistance to physical and chemical processes are challenges to be overcome. The spray drying process is widely used in dairy industry to obtain powdered milk, among other products. Although the spray drying does not intend to cause microbial inactivation, inlet air temperatures of up to 250 °C - concomitant to reduced water activity - may cause harm to microbial structures. No reports were found evaluating the inactivation of *B. cereus* spores in spray drying processes. Thus, the general objective of this work was to evaluate the impact of spray drying processes on *B. cereus* spore survival. The survival of 12 strains of *B. cereus* was evaluated by testing different conditions of air inlet temperature during spray drying process. A total of 114 independent experiments were carried out. Also, the effect of the matrix (in whole milk, talc suspension and phosphate buffered saline (PBS)) on the thermal resistance of three strains of B. cereus was examined, in a total of 27 inactivation conditions using capillary tubes. These conditions were characterized to determine which matrix could be used for the comparison made in the spray drying experiments. Also, it was evaluated the survival of three strains of B. cereus previously submitted to sub-lethal stress conditions. A total of four sub-lethal stress conditions were evaluated: treatments 1, 2 and 3 were applied heat shocks at different temperatures (80 ° C and 90 ° C) with variation in the exposure times of 10 to 30 min; and in treatment 4 there was a combination of heat shock (72  $^{\circ}$  C / 15 s), cold shock at 4  $^{\circ}$  C / 12 h and new heat shock at 72 ° C / 15 s. The results were expressed in terms of the number of decimal reductions (Gamma) caused by the spray-drying process. The survival of 12 strains of B. cereus, results shown in chapter 2, showed that  $\gamma$  values ranged from 1.1 to 4.7, with a high coefficient of variation (CV) of 46.1% among strains submitted to the drying process. Additionally, a comparative analysis between the proteome of two strains (one sensitive (540) and one resistant (436) to the spray-drying process) was performed, with a difference in protein density. Further analysis will be carried out to identify which proteins are being expressed by each strain. These experiments also allowed to choose three strains (one sensible, one intermediary and a resistant to spray drying process), that would be used in experiments reported in chapters 3 and 4. In chapter three, the z values and the thermal coefficients were determined for both the capillary tube and for spray drying process. They should not be compared and / or extrapolated, since they are processes with different characteristics. In chapter four, the application of the sublethal treatments decreased the  $\gamma$  of the B63 and 540 strains to the spray drying process. Their persistence in the powdered milk samples produced was examined after a storage period. The spore populations submitted to the 4 treatments were determined after 180 days of storage and ranged from <1.0 to 4.4 log<sub>10</sub> spores / g dry mass. The results demonstrate that although it is not a treatment applied to milk in order to inactivate microorganisms, the spray-drying process can cause up to 4.7 decimal reductions in B. cereus spores. The number of reductions varied among strains, substrate and drying air temperature. In addition, exposure of B. cereus strains to sub-lethal stress conditions leads to a decrease in the number of decimal reductions caused by the spray-drying process up to 5 times. The present study contributes to the understanding of the impact of spray drying on B. cereus in milk. This understanding is of paramount importance as it allows the modern management of food safety. From the knowledge of the number of decimal reductions caused by spray drying on *B. cereus* spores in milk, the industry can establish tougher measures in the pre-processing stages (milking and milk transport) by meet microbiological standards or specifications. The food industry, which uses powdered milk as a raw material for the formulation of several products, can use this data in the design of thermal processes in order to obtain safe and stable food from a microbiological point of view.

Keywords: heterogeneity, quantitative microbiology, sublethal stress, pathogen

<b>SUMÁRIO</b>
----------------

INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 1:1.REVISÃO DE LITERATURA	
1.1.Bacillus cereus sensu Lato	
1.2.Ocorrência de Bacillus cereus em produtos lácteos desidratados	19
1.3. Spray Drying – Processo e característica dos produtos	
1.3.1.Atomização	21
1.3.2.Contato gotículas – ar	
1.4.Microbiologia preditiva	
1.4.1.Conceitos básicos em microbiologia preditiva	
1.4.1.1.Modelos Primários	
1.4.1.1.1.Modelos de Multiplicação	
1.4.1.1.2.Modelos de Inativação	
Modelo de Bigelow (log-linear)	
Modelo de Weibull	
Modelo com ombro e cauda	
Modelo bifásico	
1.4.1.2.Modelos Secundários	
1.4.1.2.1.Modelo da raiz quadrada (Tipo Bêlehrádek)	
1.4.1.2.2.Modelo polinomial	
1.4.1.2.3.Modelos de probabilidade	
1.4.1.3.Modelos Terciários	
1.5.Heterogeneidade nos parâmetros de inativação microbiana	
1.6.OBJETIVOS E ESTRATÉGIA DE TRABALHO	
1.7.REFERÊNCIAS	
CAPÍTULO 2: Sobrevivência e análise proteômica de esporos de Bacillus cere	us submetidos
ao processo de secagem de leite integral por spray drying	51
RESUMO	53
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS	65
DISCUSSÃO	74

CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	
MATERIAL SUPLEMENTAR	
CAPÍTULO 3: Resistência de esporos de Bacillus cereus em tubos capila	ares e durante secagem
por spray drying	
RESUMO	
1. INTRODUÇÃO	
2. MATERIAL E MÉTODOS	
3. RESULTADOS	
4. DISCUSSÃO	
5. CONCLUSÃO	
6. REFERÊNCIAS	
CAPÍTULO 4:Impacto de estresses térmicos subletais na recuperação o	de esporos de Bacillus
cereus após secagem de leite integral por spray drying e estocagem por 1	180 dias 120
RESUMO	
INTRODUÇÃO	
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS	
DISCUSSÃO	
CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	
DISCUSSÃO GERAL	
CONCLUSÃO GERAL	
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	
REFERÊNCIAS	
ANEXO A	

#### INTRODUÇÃO

Os dois principais gêneros de bactérias formadoras de esporos de interesse em alimentos são *Bacillus* e *Clostridium*. Os *Bacillus* são responsáveis por aproximadamente 4,0% das doenças de origem alimentar e são um dos principais deteriorantes em alimentos (GALPERIN, 2013; WELLS-BENNIK *et al.*, 2016; ZHANG; LU, 2015). Dentro do gênero *Bacillus*, o *Bacillus cereus* é uma das espécies com maior incidência na cadeia produtiva de leites e derivados (CARLIN, 2011; KUMARI; SARKAR, 2016a; MILLER *et al.*, 2015; QUIGLEY *et al.*, 2013), podendo causar a deterioração desses produtos ou ainda produzir toxinas. Os esporos de *B. cereus* são encontrados em alta concentração no solo e nas fezes dos animais leiteiros, podendo, portanto, contaminar o leite cru. A capacidade de formação de esporos faz com que essa espécie tenha a habilidade de sobreviver aos processos térmicos comumente aplicados na indústria de produtos lácteos (GOPAL *et al.*, 2015). Os esporos de *B. cereus* são ainda capazes de aderir à superfície dos equipamentos e formar biofilmes, persistindo na linha de processamento (HUSMARK; RÖNNER, 1993; MAJED *et al.*, 2016; PEÑA *et al.*, 2014; SHAHEEN *et al.*, 2010).

Dentre os alimentos com baixa atividade de água, o leite em pó destaca-se na alimentação humana pelo seu valor nutricional como fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais (PEREIRA, 2014). Além do papel relevante na alimentação humana, possui grande importância sob o ponto de vista econômico, com uma produção mundial de 300 milhões de toneladas em 2016, movimentando cerca de 9 trilhões de dólares no mercado financeiro (ZOCCAL, 2016). O leite em pó é um produto consumido diretamente ou em formulações para produção de outros alimentos, como sobremesas lácteas, produtos de cereais, chocolates e fórmulas infantis. A presença de micro-organismos patógenos e deteriorantes em leite em pó e produtos formulados à base de leite em pó foi relatada por diversos autores (BECKER *et al.*, 1994; BEUCHAT *et al.*, 2013; IN'T VELD; SOENTORO; NOTERMANS, 1993; LICARI, 1970; REYES; BASTÍAS; *et al.*, 2007; ZHANG, Z. *et al.*, 2012), sendo, portanto, importante o controle da contaminação microbiana ao longo da cadeia produtiva de lácteos (LANG *et al.*, 2017).

A resistência ao estresse térmico e a variação fenotípica dos esporos de *B. cereus* são um desafio para a indústria de lácteos (CEUPPENS; BOON; UYTTENDAELE, 2013; KUMARI; SARKAR, 2016b;). A resistência ao calor é adquirida durante a formação do esporo, sendo que parte dessa resistência está associada à formação do dipicolinato de cálcio e à redução do teor de água no cerne do esporo (GRANGER *et al.*, 2011; SANCHEZ-SALAS *et al.*, 2011). Além disso, o processo de maturação que envolve a síntese de proteínas da capa do esporo é uma etapa crítica para a formação da resistência térmica (ABHYANKAR *et al.*, 2011). Os mecanismos de adaptação ao calor incluem o aumento na síntese de um conjunto de proteínas conhecidas como *Heat Shock Proteins* (HSPs), reguladas pelo fator sigma B e que desempenham a reparação, prevenção e manutenção do equilíbrio homeostático das células (PERIAGO *et al.*, 2002).

No ambiente, os micro-organismos são frequentemente expostos à condições estressantes como calor, acidez, choque osmótico, congelamento e esgotamento de nutrientes, os quais induzem a mecanismos de resposta ao estresse, como síntese de proteínas HSPs, fluidização da parede celular, dentre outros (JOHNSON, 2003). Esses mecanismos promovem a adaptação das células e influenciam na resistência térmica dos esporos afetando a variabilidade das cepas. A quantificação dessa influência permite uma abordagem mais segura e realista do comportamento microbiano em alimentos ou processos industriais (ARYANI *et al.*, 2015; DEN BESTEN; BERENDSEN; *et al.*, 2017a). Desconsiderar a variabilidade microbiana pode permitir a sobrevivência de cepas mais resistentes e resultar na deterioração do produto ou na ocorrência de surtos de doenças veiculadas por alimentos (DEN BESTEN; ARYANI; *et al.*, 2017; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2013).

Os micro-organismos submetidos ao processo de secagem por *spray drying* são expostos a condições de estresse osmótico devido à desidratação e às altas temperaturas utilizadas na secagem, o que afeta a sobrevivência destes micro-organismos devido aos danos causados no DNA, RNA e na membrana citoplasmática (HUANG; VIGNOLLES; *et al.*, 2017; PÉREZ-CHABELA *et al.*, 2013). No entanto, os esporos microbianos são pouco injuriados pelo calor e pelo choque osmótico causado por este processo, devido à alta desidratação do material genético presente no núcleo do esporo (IN'T VELD; SOENTORO; NOTERMANS, 1993; TIBURSKI *et al.*, 2014).

Considerando o exposto, o objetivo desse trabalho foi realizar a modelagem estocástica e determinar a variabilidade da sobrevivência de 12 cepas de *B. cereus* ao processo de secagem por *spray drying* em diferentes condições de secagem por *spray dryer* em escala de laboratório utilizando-se suspensões inoculadas em leite integral, leite desnatado e suspensão de talco. Além disso, foi determinada a resistência térmica em tubo capilar de três cepas de *B. cereus* em leite

integral, suspensão de talco e tampão fosfato salino (PBS). E por fim, foi avaliada tolerância induzida por processos de estresse térmico subletais aplicados antes do processo de secagem e a sobrevivência durante o período de estocagem.

# CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

#### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1. Bacillus cereus SENSU LATO

O *Bacillus cereus sensu lato* é o principal grupo responsável por doenças de origem alimentar dentro do gênero *Bacillus*. Este grupo é formado por oito espécies estreitamente relacionadas *B. anthracis*, *B. pseudomycoides*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. citotoxicus*, *B. toyonensis* e *B. cereus sensu stricto* (CARLIN, 2011).

O grupo *B. cereus* é um bastonete Gram-positivo, formador de esporos, móvel, aeróbico facultativo, com temperatura ótima de multiplicação entre 30 e 37 °C, mas existem espécies que são capazes de se multiplicar em temperaturas abaixo de 4 °C e acima de 50 °C. Para os fatores intrínsecos como pH e atividade de água, as faixas ótimas de multiplicação variam entre 4,3 e 9,3, para o pH e entre 0,91 e 0,99, para a atividade de água (OKINAKA; KEIM, 2016). Esse micro-organismo e seus esporos estão ubiquamente distribuídos no meio ambiente e, são comumente isolado de solo, água, plantas e animais e, sendo encontrados em alta concentração em fezes de bovinos (HEYNDRICKX, 2011).

A capacidade toxigênica de B. cereus é fator preocupante para a indústria de alimentos, pois esse micro-organismo pode causar dois tipos de síndromes: emética e diarreica. A síndrome emética é causada por um peptídeo denominado cerulida, resistente ao calor e a variações de pH. A cerulida é produzida durante a multiplicação do micro-organismo no alimento, a partir de populações de  $10^5$  UFC/ g ou mL, sendo altamente estável às condições ácidas do estômago e às enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal (KUMARI; SARKAR, 2016a). A síndrome emética é caracterizada por náuseas e vômitos; os sintomas podem aparecer entre 30 min e 6 h após o consumo de alimentos contaminados com doses a partir de 0,03 µg de cerulida (BENNETT; TALLENT; HAIT, 2015). A síndrome diarreica está associada as enterotoxinas: hemolisina BL (HBL), enterototoxina não hemolítica (NHE) e citotoxina K. Essa síndrome é causada pela ingestão de células de *B. cereus*, em concentrações a partir de  $10^4$  UFC/ g ou mL de alimento. As células de *B.* cereus aderem e colonizam o lúmen do intestino, e após a colonização as enterotoxinas são produzidas e provocam a formação de poros na membrana celular do hospedeiro, que induzem um desequilíbrio eletrolítico no organismo. Os sintomas dessa síndrome se iniciam entre 8 e 16 horas após a ingestão do alimento contaminado e podem permanecer por 12 a 24 h, com sintomas como dores abdominais, cólicas e diarreia aquosa (CEUPPENS; BOON; UYTTENDAELE, 2013; KOTIRANTA; LOUNATMAA; HAAPASALO, 2000).

Além do potencial toxigênico, o *B. cereus* produz enzimas extracelulares, como lipases e proteases que causam gelificação, amargor e coagulação do leite e produtos lácteos. As alterações causadas pela presença de *B. cereus* são importantes do ponto de vista tecnológico, porque provocam a redução do tempo de vida útil e alterações sensoriais indesejáveis em produtos lácteos. (CARLIN, 2011; KUMARI; SARKAR, 2014). A capacidade de formação de esporos permite ao *B. cereus* a sobrevivência, resistência e persistência em condições adversas por longos períodos de tempo. (BENNETT; TALLENT; HAIT, 2015). A estrutura do esporo confere a proteção ao material genético e às enzimas que atuam no processo de ativação e germinação do esporo. Essa estrutura permite a sobrevivência aos tratamentos térmicos severos e a condições extremas de desidratação. (SETLOW, P., 2006; SUNDE *et al.*, 2009).

A presença de esporos de *B. cereus* tem sido relatada em diversos alimentos com baixa atividade de água como: massas, formulas infantis, temperos, especiarias e leite e produtos lácteos. (BECKER *et al.*, 1994; BEUCHAT *et al.*, 2013; LANG *et al.*, 2017; REYES; BASTIAS; *et al.*, 2007). A resistência ao calor permite que os esporos de *B. cereus* sobrevivam aos processos térmicos e de desidratação aplicados na indústria de alimentos. A variabilidade na resistência de esporos de *B. cereus* pode estar associada às condições ambientais e a variabilidade intra-espécie (OKINAKA; KEIM, 2016). Relatos na literatura indicam variações nos valores D<sub>90 °C</sub> entre 2,8 min e 100 min (GAILLARD; LEGUERINEL; MAFART, 1998; LUU-THI; KHADKA; MICHIELS, 2014; MAZAS, MARGARITA *et al.*, 1999). A resistência ao estresse térmico e a variação fenotípica dos esporos de *B. cereus* são um desafio para a indústria de lácteos (CEUPPENS; BOON; UYTTENDAELE, 2013; KUMARI; SARKAR, 2016b; SCHIE; HUSER, 2013).

#### 1.2. OCORRÊNCIA DE Bacillus cereus EM PRODUTOS LÁCTEOS DESIDRATADOS

Os principais micro-organismos presentes no leite cru são *Pseudomonas,* enterobactérias, bactérias lácitcas e micro-organismos esporulados do gênero *Bacillus* e *Clostridium* (QUIGLEY *et al.*, 2013). A manutenção das práticas de higiene nos equipamentos de ordenha e refrigeração são essenciais para reduzir a contaminação do leite cru. (HEYNDRICKX, 2011). As principais rotas de contaminação por *Bacillus* na cadeia de lácteos são as fezes de animais, em que o número de esporos excretados é relativamente alto; a água e o solo (CARLIN, 2011; MAGNUSSON; CHRISTIANSSON; SVENSSON, 2007). Além disso, a hidrofobicidade do esporo potencializa a capacidade de adesão e a formação de biofilme em superfícies, tubulações e equipamentos (CARLIN, 2011; KUMARI; SARKAR, 2014; PEÑA

*et al.*, 2014). A microbiota presente no leite cru é consideravelmente diferente da microbiota presente no leite em pó. Os processos térmicos e mecânicos reduzem a contaminação de células vegetativas e aumentam a prevalência de micro-organismos esporulados (MILLER *et al.*, 2015). Essa contaminação pode permanecer principalmente em produtos lácteos processados como leite em pó, leite UHT e leite pasteurizado (BECKER *et al.*, 1994; OWUSU-KWARTENG *et al.*, 2017; REYES; BASTÍAS; *et al.*, 2007; SADIQ *et al.*, 2016). A incidência e a prevalência de *B. cereus* em produtos lácteos em pó foram confirmadas em amostras de 13 países (BECKER *et al.*, 1994; REYES; BASTÍAS; *et al.*, 2007) e variou entre 0,3 a 10<sup>3</sup> esporos/g. A análise de 175 amostras de leite em pó demonstrou uma incidência de 43% de *B. cereus* (contagem entre 3 e 10<sup>4</sup> esporos/g) (REYES; BASTÍAS; *et al.*, 2007). Embora, os produtos lácteos em pó não ofereçam condições para a germinação de esporos, quando os esporos de *B. cereus* encontram condições favoráveis, estes podem germinar, multiplicar e produzir toxinas (REYES; BASTÍAS; *et al.*, 2007). Esse fenômeno pode reduzir a vida de prateleira do produto e impactar a saúde do consumidor (MARTINEZ *et al.*, 2016; PEÑA *et al.*, 2014; REYES; BASTÍAS; *et al.*, 2007).

#### 1.3.SPRAY DRYING – PROCESSO E CARACTERÍSTICA DOS PRODUTOS

O processo de secagem por *spray drying* é uma operação unitária que converte materiais líquidos em produtos em pó. O processo de secagem por *spray drying* é provavelmente o mais eficiente e mais econômico dentre os existentes utilizados na indústria de alimentos, porque é um equipamento relativamente simples e que permite uma porudução em grande escale e em fluxo contínuo. Além disso, os materiais em pó são de fácil estocagem, transporte, armazenamento e manuseio (CAL; SOLLOHUB, 2010). O conceito de *spray drying* foi proposto por Samuel Perry em 1872, mas foi disseminado na indústria a partir dos anos 1980. Atualmente o *spray drying* é uma prática comum na indústria de produtos lácteos, mas também tem ampla aplicação na produção de fármacos, detergentes, pigmentos, compostos bioativos, dentre outros (BHANDARI, B. R.; PATEL; CHEN, 2008; CAL; SOLLOHUB, 2010; SOLLOHUB; CAL, 2010; WISNIEWSKI, 2015). A indústria de produtos lácteos é o setor produtivo que tem maior aplicação do processo de *spray drying*. Além do leite em pó são produzidos outros derivados como: concentrados proteicos, soro em pó, proteínas isoladas, com ampla aplicação tecnológica na indústria de alimentos (ADHIKARI *et al.*, 2009).

O processo se dá pela transformação de uma alimentação fluida (solução, suspensão ou pasta) em um produto seco por uma operação contínua. A suspensão atomizada é transformada em gotículas que entram em contato imediato com uma corrente de gás quente, geralmente o ar (ANANDHARAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015). O contato das gotículas formadas na pulverização com o ar em elevada temperatura (200°C) promove um diferencial de temperatura e pressão que resulta na transferência de calor do ar para a gotícula, removendo a água e formando o pó. O processo de remoção de agua é facilitado pela área superficial da gotícula, que promove uma rápida evaporação da água, reduzindo os danos causados pelo calor (BIRCHAL; PASSOS, 2005). Na Figura 1 está apresentado o diagrama esquemático do *spray dryer*.



Figura 1. Diagrama esquemático do spray dryer.

Adaptado de (SHISHIR; CHEN, 2017)

O processo de secagem por *spray drying* pode ser dividido em 4 estágios: (i) atomização da alimentação; (ii) contato gotículas – ar; (iii) evaporação da umidade; (4) separação do produto a ser seco do ar de saída.

#### 1.3.1. Atomização

O processo de atomização é a dissolução do líquido de alimentação em um grande número de gotículas, promovendo o aumento a área de contato do produto a ser seco. O contato da gotícula com o ar quente permite a troca térmica e a transferência de massa, causando a evaporação da água contida no produto. A atomização é o processo central para a secagem por spray drying, pois influencia na forma, estrutura, velocidade e distribuição de tamanho das gotículas, e também na natureza e no tamanho do produto final (ANANDHARAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015). A relação entre a superfície e o volume da gotícula determina o tempo de secagem e as características das partículas, porque o tempo de secagem é proporcional a dimensão da partícula (CAL; SOLLOHUB, 2010). O princípio de funcionamento dos atomizadores é regido pelo fenômeno da desintegração líquida, no qual um jato de líquido, inicialmente de raio constante, cai verticalmente sob ação da gravidade e decompõem-se em uma corrente de gotículas (ANANDHARAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015; WISNIEWSKI, 2015). A seleção de um atomizador é uma das etapas mais importantes no projeto de um secador do tipo Spray Dryer. O atomizador determina as características de alimentação, a energia necessária para a formação do jato spray, bem como tamanho, distribuição, velocidade, trajetória da gota e consequentemente a característica final da partícula (BIRCHAL; PASSOS, 2005). Os principais atomizadores que podem ser aplicados para a produção de leite em pó são: (i) atomizador rotativo ou centrífugo: a alimentação ocorre no centro de um disco ou cavidade giratória; (ii) atomizador de bico pressurizado: a alimentação do líquido é forçada a alta pressão (0,07 a 0,3 Mpa); (iii) atomizador de bico de duplo fluido: o ar comprimido gera uma turbulência que atomiza o líquido. A pressão de operação é menor que a pressão do atomizador de bico pressurizado (WISNIEWSKI, 2015).

#### 1.3.2. Contato gotículas – ar

O contato entre a gotícula e o ar pode ocorrer em: (i) escoamento concorrente; (ii) contracorrente; (iii) escoamento misto (CAL; SOLLOHUB, 2010). No escoamento concorrente, as gotículas atomizadas entram no secador em contato direto com o ar quente e seguem na mesma direção. Neste arranjo, a alta taxa de evaporação da água mantém a temperatura da partícula próxima a temperatura de bulbo úmido. O trajeto descendente das gotículas promove a redução da temperatura que minimiza a degradação térmica dos componentes dos alimentos. Essa configuração é a mais utilizada na indústria de alimentos, porque a temperatura do produto final é menor que a temperatura de entrada, a umidade do pó é relativamente baixa, e a geometria do equipamento é a mais simples e pode ser aplicada em uma ampla faixa de produtos (KOCA; ERBAY; KAYMAK-ERTEKIN, 2015). Na

configuração contracorrente as gotículas e o ar de secagem entram em extremidades opostas da câmara de secagem. Neste arranjo, a temperatura do ar de exaustão está próxima da temperatura do ar de alimentação. Essa configuração de secagem por atomização é usado para produtos que não são degradados calor, que necessitam de partículas grosseiras ou com porosidade especial, ou ainda com densidade elevada. No fluxo misto, o desenho da câmara de secagem incorpora o fluxo concorrente e contracorrente. O produto obtido neste tipo de secador é um pó mais grosso, devido a elevada temperatura de saída, deve ser aplicado a produtos resistentes ao calor (CAL; SOLLOHUB, 2010; WISNIEWSKI, 2015).

#### 1.3.3. Evaporação da umidade

A evaporação é descrita por dois períodos de secagem distintos: um no qual a taxa de secagem é constante e a pressão de vapor se mantém constante na superfície da gota; e outro no qual a taxa de secagem decai, denominado velocidade de secagem decrescente (CAL; SOLLOHUB, 2010).

Na etapa de secagem constante, a umidade de sólido forma um filme na superfície da gotícula, sendo desprezível a presença do sólido. A velocidade de secagem nesta etapa do processo é controlada pelas condições externas. O aumento na temperatura ou na vazão do ar de secagem resultam no aumento da velocidade de secagem. Após este período, a temperatura da partícula aproxima-se da temperatura de bulbo úmido do ar de secagem. No final desse período tem-se o valor de umidade crítica, a partir desse ponto, a taxa de difusão da água interna é insuficiente para manter um filme de água contínuo cobrindo a área seca (CHEN, X.D, 2008).

Na etapa de velocidade de secagem decrescente, a mobilidade molecular da água é dificultada pela necessidade de migração pelos canais reticulares formado no sólido. Esse período é dependente do material utilizado no processo de secagem (ANANDHARAMAKRISHNAN; ISHWARYA, 2015; WISNIEWSKI, 2015). A temperatura da partícula, no final do processo de secagem, aproxima-se da temperatura de bulbo úmido do ar de secagem até atingir a temperatura de saída do *spray dryer* (BHANDARI, B. R., 2013).

#### 1.3.4. Separação da partícula

O produto obtido após a secagem é recuperado por dois sistemas: um primário e um secundário. Na seção primária, o pó é coletado na base do secador e removido por um sistema pneumático. Uma fração do produto seco é carregada com o ar e segue para o equipamento de

separação secundária. Para a recuperação de produtos secos, destacam-se três escolhas: ciclones, filtros de manga e precipitadores eletrostáticos, sendo o primeiro método mais aplicado. Na sua operação o ar contendo as partículas entra no ciclone com uma trajetória helicoidal. No ciclone, as partículas são separadas da corrente de ar, sendo recolhidas em coletor situado na parte inferior do ciclone (WU *et al.*, 2014).

#### 1.4. MICROBIOLOGIA PREDITIVA

O conceito de Microbiologia Preditiva foi introduzido na Ciência de Alimentos a partir dos anos 90 com a popularização dos computadores e de ferramentas computacionais cada vez mais robustas. No entanto, sabe-se que modelos matemáticos são utilizados na indústria de alimentos desde os anos 20, por exemplo, para o desenho de processos térmicos (esterilização/pasteurização) para o processamento de alimentos. Com o aumento da disponibildade de ferramentas computacionais, os modelos matémáticos foram aprimorados e suas aplicações foram expandidas, a nível de pesquisa acadêmica e industrial (NAKASHIMA et al. 2000; BARANYI & ROBERTS 1994; JAGANNATH & TSUCHIDO 2003).

A Microbiologia Preditiva é uma especialidade da microbiologia de alimentos que tem por objetivo quantificar o comportamento microbiano (multiplicação, inativação, interações, produção de metabólitos e etc.) nos alimentos, com o uso de equações e/ou métodos estatísticos. Estes descrevem um sistema real, ou seja, um alimento, baseando-se nas propriedades mais significativas dos alimentos (pH, temperatura, atividade de água, teor de sal, etc). Desta forma, os modelos preditivos podem fornecer informações a respeito do comportamento dos microorganismos nos alimentos em diversas condições ambientais. Além disso, os modelos preditivos podem ser incorporados nos sistemas de gestão da segurança dos alimentos, como APPCC e programas de segurança baseados em métricas de risco e podem também ser usados para desenvolvimento e melhoria de formulações. Os modelos podem também auxiliar na determinação das condições de armazenamento, influenciando na escolha da condição que garantirá o controle de determinados micro-organismos (MCMEEKIN, T. *et al.*, 2013; MCMEEKIN, T. A. *et al.*, 2002).

#### 1.4.1. Conceitos básicos em microbiologia preditiva

A primeira e mais importante definição em microbiologia preditiva é modelo. O termo modelo matemático ou modelo preditivo refere-se a um conjunto de hipóteses expressas por meio de funções matemáticas e/ou equações. Os modelos preditivos são ferramentas que descrevem um

sistema real (alimento ou processo) com o auxílio dessas funções matemáticas e/ou equações. Em um consenso geral, um modelo é um sistema simplificado que descreve um alimento ou um processo e suas respostas são preditas de acordo com as condições iniciais especificadas (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013).

Os modelos preditivos devem, também, levar em consideração o estado fisiológico das células dos micro-organismos, pois o comportamento microbiano depende da espécie e também dos estresses que estes sofreram ao longo do processamento de alimentos. A precisão nos valores preditos pelo modelo está associada às informações constantes no modelo, como características do produto (pH, atividade de água, teor de sal, etc) e condições de processamento (temperatura, atmosfera gasosa, etc) (BERNAERTS *et al.*, 2004; DENS; VAN IMPE, 2001; NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000)

Outra propriedade importante dos modelos preditivos é a sua robustez. A robustez de um modelo preditivo está diretamente ligada à coleta de dados experimentais. Essa é a parte mais minuciosa e crítica do trabalho, pois é nela que se obtém a resposta microbiana frente aos impactos ambientais analisados (MCMEEKIN, T. A. *et al.*, 2002; RASCH, 2003). Com essas informações inseridas no modelo, pode-se descrever e analisar a interação microbiana com o processo e a matriz alimentar. O desenho experimental também é fator fundamental para obtenção de dados precisos porque, nesta etapa define-se as variáveis independentes (fatores a serem analisados), as faixas a serem estudadas e a variável dependente (resposta). Os modelos preditivos são classificados em três níveis de acordo com a estrutura e propósito: primário, secundário e terciário (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013). O desenvolvimento de um modelo preditivo pode ser ilustrado na Figura 2. É importante ressaltar que ao se desenvolver um modelo preditivo, não é sempre requerido atingir-se o nível terciário. Dependendo das aplicações, somente o modelo primário e/ou secundário são suficientes.



Figura .2 Etapas de desenvolvimento de modelos preditivos.

#### 1.4.1.1.Modelos Primários

Os modelos primários são equações matemáticas que descrevem a variação dos parâmetros de multiplicação/inativação microbiana em função do tempo. Uma característica destes modelos é descrever a cinética microbiana com poucos parâmetros. Os modelos primários são geralmente baseados em hipóteses biológicas ou mecanísticas (sem significado biológico) (MCKELLAR; LU, 2003).

#### 1.4.1.1.1. Modelos de Multiplicação

A curva de multiplicação microbiana é caracterizada pelas seguintes fases: fase de adaptação (lag), fase exponencial (log), fase estacionária e fase de declínio ou morte (Figura 3).



Figura 3. Curva de multiplicação microbiana

Os modelos cinéticos de primeira ordem mais utilizados e conhecidos para descrever a multiplicação microbiana são os modelos de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994) e Gompertz Modificado (ZWIETERING *et al.*, 1991).

A equação de Baranyi é um modelo mecanístico que descreve a multiplicação microbiana. A fase exponencial é descrita por uma função linear e a fase lag é determinada por uma função de ajuste. Essa função assume que os micro-organismos sintetizam um substrato desconhecido como um sinal para o início da multiplicação microbiana (BARANYI; ROBERTS, 1994). A equação (1) está descrita abaixo:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{\gamma_{max}-\gamma_0}}\right)$$
(1)

Onde : y(t) = concentração de células no tempo (t);  $y_0$ = concentração inicial de células no tempo 0 (t=0);  $y_{max}$  = concentração máxima de células;  $\mu_{max}$  = velocidade específica de multiplicação; A(t) = função de ajuste no tempo (t)

A função de ajuste A (t) é uma equação matemática que descreve o estado fisiológico da célula, considerando as características do meio e dos micro-organismos. Essa função é um termo

importante do modelo, pois considera a influência de diferentes fatores ou variáveis no metabolismo microbiano (BARANYI; ROBERTS, 1994).

O modelo de Gompertz modificado (Equação 2) é descrito por uma função sigmoidal assimétrica. Esse modelo foi reparamentrizado, ou seja, foram inseridos termos matemáticos que apresentam significados biológicos. Os termos A e µmax, representam a população máxima alcançada e a velocidade específica de multiplicação, respectivamente. Essa modificação foi proposta por Zwietering et al (ZWIETERING *et al.*, 1991).

$$y = A \cdot e^{-e^{\left\{\left[\frac{\mu_{max.e.}}{A} (\lambda - t)\right] + 1\right\}}}$$
(2)

Onde: y= logaritmo da concentração de células, A= população máxima inicial atingida;  $\mu$ máx = velocidade específica de multiplicação;  $\lambda$  = tempo de lag

#### 1.4.1.1.2. Modelos de Inativação

O uso de modelos matemáticos para cálculos e desenho de processos térmicos data do início do século XX. A compreensão da cinética de inativação dos micro-organismos é um fator fundamental para a garantia da segurança e estabilidade microbiológica dos alimentos, pois através dela é possível determinar o ponto final de um processo de inativação microbiana. (MCKELLAR; LU, 2003)

A inativação microbiana pode seguir cinética log-linear ou ela também pode sofrer desvios da linearidade, que são caracterizados pela presença de ombro e/ou cauda (Figura 3). Desta forma, existem modelos de inativação para descrever a inativação microbiana em função do formato da curva que representa sua morte com o passar do tempo (DOLAN *et al.*, 2015). Os modelos preditivos podem ser divididos em dois tipos básicos: lineares e não-lineares. O primeiro tipo é representado pelo modelo log-linear tradicional (Bigelow), e o segundo grupo surgiu como consequência dos desvios de linearidades apresentados nas curvas de sobrevivência dos micro-organismos (Figura 4). Existem diversos tipos de modelos que descrevem cinética de inativação não linear. Todavia, iremos nos ater aqui à alguns modelos de maior importância. Os desvios da linearidade podem ser explicados por diversos fatores, tais como: presença de culturas mistas (e que possuem diferentes resistências térmicas), adaptação microbiana ao longo do processo, formação de aglomerado de células (que dificulta a

penetração e efeitos deletérios do calor), efeito protetor da matriz alimentar ou ainda o efeito protetor das células mortas (MARKS, 2008). Na Figura 4 são apresentados exemplos do formato das curvas de inativação microbiana (i) log-linear, (ii) contendo ombro, (iii), contendo cauda, (iv) contendo ombro e cauda, e (v) bifásico.



Figura 4. Representação gráfica dos principais formatos das curvas de inativação microbiana. Fonte: Adaptado de (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013).

#### Modelo de Bigelow (log-linear)

O modelo de Bigelow assume uma cinética de primeira ordem, ou seja, a inativação microbiana é descrita por uma reta. Esse modelo foi aplicado pela primeira vez em 1920 para descrever a inativação de micro-organismos submetidos ao processamento térmico. Ainda hoje, é o modelo mais aplicado na indústria de alimentos enlatados de baixa acidez, considerando-se como alvo o *Clostridium botulinum* (PFLUG, 1999). O modelo está apresentado na Equação 3.

$$\log \frac{N}{N_0} = \frac{-t}{D} \quad (3)$$

Onde: N= concentração de células final; N<sub>0</sub>= concentração de células inicial; D= tempo necessário para causar uma redução decimal na população microbiana; t = tempo

A partir do cálculo do D em três diferentes temperaturas, pode-se calcular o valor z (Equação 4), que é a variação de temperatura necessária para se causar uma redução decimal

na resistência térmica do micro-organismo alvo do processo térmico. Conhecendo-se o z e história térmica a que o produto é exposto durante o processamento térmico, pode-se calcular a destruição do micro-organismo alvo e assim calcular-se a letalidade (Equação 5) do referido processo.

$$z = \frac{T_{ref} - T}{\log D - \log D_{ref}} \qquad (4)$$

$$L = 10^{\frac{T - T_{ref}}{z}} \tag{5}$$

#### Modelo de Weibull

O modelo de Weibull foi desenvolvido usando como princípio a distribuição estatística de Weibull, que é uma distribuição de probabilidade contínua. O modelo de Weibull considera que a inativação de uma célula ou esporo microbiano é variável de um indivíduo para outro, sendo a dispersão da resistência térmica individual governada pela distribuição de Weibull, que em sua forma cumulativa pode ser representada pela Equação 6 (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013).

$$N = N_0 e^{-kt^p} \tag{6}$$

Onde: N representa o número de sobreviventes após um tempo t, N<sub>0</sub> é a população inicial e para uma determinada temperatura, tem-se valores específicos para os parâmetros da distribuição, k e p.

Na forma decimal, este modelo é descrito conforme a Equação 7

$$\log \frac{N}{N_0} = -bt^p \qquad (7)$$

A Equação7 pode ser escrita da seguinte forma::

$$\log S(t) = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \qquad (8)$$

Onde: S= fração de sobreviventes;  $\delta$ = tempo necessário para a primeira redução decimal; p= parâmetro de curvatura; t = tempo. Quando p=1, a cinética de inativação é log-linear, enquanto com p>1 e p<1, o modelo de Weibull descreve curvas de inativação côncavas descendentes e ascendentes, respectivamente.

#### Modelo com ombro e cauda

Os modelos com ombro e cauda consideram que há um período de lag no início do processo de inativação microbiana e uma cauda após o processo de inativação. O primeiro tipo de curva descrita por esse modelo é uma curva plana que possui atraso na cinética de inativação microbiana, antes do início do processo de inativação (Figura 4). O segundo tipo de curva é quando ocorre a presença de cauda, no final do processo de inativação dos micro-organismos, sendo que este fenômeno está associado à resistência de uma determinada fração da população microbiana (CAPPUYNS; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2012). O modelo está descrito na Equação 9. Esse modelo foi desenvolvido por Geeraerd; Herremans; Van Impe (2000).

$$\log N = \log \left[ (10^{\log N_0} - 10^{\log N_{res}}) e^{-k_{max}t} \left( \frac{e^{k_{max}Si}}{1(e^{k_{max}Si} - 1)e^{k_{max}t}} \right) + 10^{\log N_{res}} \right]$$
(9)

Onde: N= concentração de células no tempo t; N<sub>0</sub>= concentração de células inicial N<sub>res</sub>= concentração de células residuais ao final da inativação  $k_{max}$ = taxa de inativação; Si = comprimento do ombro (equivalente em unidade de tempo);

#### Modelo bifásico

O modelo bifásico é baseado na existência de duas subpopulações. Uma parte que sofre inativação rápida (sensível) e outra parte que é mais resistente e será inativada mais lentamente. Assim, esse tipo de curva (Figura 3) apresenta dois segmentos distintos, ambos linearmente decrescentes. A segunda parte da reta apresenta menor inclinação, porque representa a subpopulação mais resistente, ou seja, o processo de inativação ocorrerá de forma mais lenta (CAPPUYNS; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2012). O modelo está apresentado na equação 10. Esse modelo foi desenvolvido por Cerf (1977).

$$\log \frac{N}{N_0} = \log (f \, e^{k_{max_1} t} \, +) (1 - f) e^{k_{max_2} t} \tag{10}$$

Onde N= população no tempo t; N<sub>0</sub>= população no tempo zero; f= fração da subpopulação (menos resistente); k<sub>max1</sub>= taxa de inativação da subpopulação f; (1-f) = subpopulação mais resistente; k<sub>max2</sub> = taxa de inativação da subpopulação (1-f).

#### 1.4.1.2. Modelos Secundários

Os modelos secundários são equações que descrevem a influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos nos parâmetros de multiplicação tempo de *lag*, velocidade específica de multiplicação ou parâmetros de inativação dos micro-organismos. Essas equações são capazes de predizer como a variação de fatores intrínsecos e extrínsecos e suas interações influenciam os parâmetros cinéticos que descrevem o comportamento microbiano. As equações mais utilizadas para construção dos modelos secundários são derivadas de funções lineares, polinomiais ou exponenciais. No entanto, os modelos secundários, também podem ser equações diferenciais, redes neurais artificiais e modelos de probabilidade (ROSS; DALGAARD, 2004).

#### 1.4.1.2.1. Modelo da raiz quadrada (Tipo Bêlehrádek)

O modelo da raiz quadrada (Equação 11) é uma equação empírica que está baseada na relação existente entre a velocidade específica de multiplicação microbiana e a temperatura. Cabe ressaltar, todavia, que esse modelo pode também ser aplicado para modelagem secundária do tempo de adaptação (*lag*), ou seja, como a variação dos fatores intrínsecos/extrínsecos pode influenciar o tempo de *lag*. Esse modelo preconiza que a velocidade específica de multiplicação ou tempo de *lag* do micro-organismos aumentam linearmente com o aumento na diferença de temperatura. No modelo original, esse aumento está relacionado com o aumento na diferença entre a temperatura (*T*) e o zero biológico (temperatura na qual a atividade metabólica será mínima não propiciando condições para multiplicação microbiana) (*T*<sub>0</sub>) (RATKOWSKY *et al.*, 1983).

$$k = a \cdot (T - T_0)^d$$
 (11)

Onde: a e d = constantes do modelo; T = temperatura (°C);  $T_0$ = zero biológico (°C); k= velocidade específica de multiplicação.

Com a modificação do modelo original proposta por Ratkwosky em 1983, a equação teve o "biológico zero" substituído por uma temperatura mínima, na qual a velocidade específica de multiplicação ou tempo de lag é igual a zero. Essa temperatura é hipotética e representa o intercepto, ou seja, é a velocidade específica de multiplicação ou tempo de lag na a qual reta corta o eixo da temperatura (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013; ROSS; DALGAARD, 2004).

$$\sqrt{k} = b. \left( T - T_{min} \right) \tag{12}$$

Onde: k= velocidade específica de multiplicação; b= constante do modelo; T= temperatura; T<sub>min</sub> = temperatura teórica mínima

O modelo da raiz quadrada pode ser modificado (Equação 13) e novos termos, como atividade de água e pH, dentre outros, podem ser incluídos para que os efeitos destes fatores e suas interações sobre os parâmetros primários sejam considerados. Esse modelo, é um dos mais aplicados na microbiologia preditiva devido ao bom ajuste com a inserção de novos parâmetros matemáticos.(ROSS; DALGAARD, 2004).

$$\sqrt{k} = b. (T - T_{min}). (a_w - a_{w min})$$
 (13)

Onde: *k* velocidade específica de multiplicação; b= constante do modelo; T= temperatura;  $T_{min}$  = temperatura teórica mínima;  $a_w$ = atividade de água;  $a_{wmin}$  = atividade de água teórica mínima;

A transformação dos dados para logaritmo natural (ln), muitas vezes torna-se necessária para a redução da variância dos dados experimentais. Essa situação é muito comum para o tempo de *lag*. O modelo da raiz quadrada pode ser reescrito da seguinte forma (ROSS; DALGAARD, 2004):

$$\ln(k) = b.(T - T_{min})$$
 (14)

Onde k = tempo de lag; b= constante do modelo; T= temperatura;  $T_{min}$  = temperatura teórica mínima

#### 1.4.1.2.2. Modelo polinomial

Os modelos polinomiais ou de superfície de resposta (RSM) são modelos empíricos que podem incluir diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o comportamento microbiano. O modelo polinomial pode ser obtido com regressões lineares ou não lineares. Esses modelos podem conter termos lineares, quadráticos, cúbicos e recíprocos e ainda a interação dos fatores analisados. Esses modelos podem ser aplicados para descrever o aumento da população dos micro-organismos, o tempo de adaptação e a velocidade específica de multiplicação (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013; ROSS; DALGAARD, 2004).

A equação genérica de um modelo polinomial (superfície de resposta) está apresentada abaixo:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_1^2 + b_5 x_2^2 + b_6 x_1^2 + b_7 x_1 x_2 + b_8 x_1 x_3 + b_9 x_2 x_3$$
(15)

Onde:  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_n$  = coeficientes de regressão;  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  = fatores ambientais (pH, temperatura, atividade de água)

1.4.1.2.3. Modelos de probabilidade

Os modelos de probabilidade são também chamados de "multiplica/não-multiplica". Com o uso destes modelos pode-se determinar os limites e as condições nas quais haverá ou não multiplicação de um patógeno, produção de toxinas e/ou produção de um metabólito associado a deterioração de um alimento por um micro-organismo deteriorador em função da combinação de fatores intrínsecos, extrínsecos e suas interações (LOBACZ; KOWALIK, 2015).

Esse modelo pode ser aplicado em estudos de modificações de formulações, métodos de conservação para alimentos minimamente processados e também para estimativas de risco microbiológico. As respostas estimadas por esses modelos podem ser aplicadas para a determinação de limites absolutos de multiplicação microbiana, ou seja, alguns fatores intrínsecos, por si só, não podem inibir a multiplicação, mas quando combinados com outras barreiras são capazes de reduzir ou impedir a multiplicação microbiana. Sendo assim, com essas informações os processadores de alimentos podem aplicar modificações no processamento e/ou formulações e estimar a probabilidade de multiplicação e /ou deterioração e estimar a vida de prateleira de um alimento (VERMEULEN *et al.*, 2009).

#### 1.4.1.3. Modelos Terciários

O desenvolvimento dos modelos terciários tem papel importante na microbiologia preditiva, pois essas ferramentas permitem que os usuários estimem o comportamento microbiano em diferentes matrizes (alimentos ou meio de cultura) e diferentes condições ambientais. Os dados inseridos nos modelos terciários geralmente partem de estudos do comportamento microbiano em meios de cultura sob condições controladas (pH, aw, etc), posteriormente são validados em matrizes alimentares simulando condições reais. Os modelos terciários são a integração dos modelos primários e/ou secundários em plataformas de uso amigável (*softwares* para download ou disponíveis online). As interfaces amigáveis utilizadas pelos modelos terciários têm a função de transcrever equações complexas dos modelos primários e/ou secundários de forma simples, visando sua ampla aplicação por usuários não familiarizados com o desenvolvimento de modelos preditivos. Na Figura 5 apresenta-se um esquema de desenvolvimento de um modelo terciário (TAMPLIN; BARANYI; PAOLI, 2003). O primeiro passo para a elaboração de um modelo secundário é a coleta de dados de multiplicação e sobrevivência de micro-organismos, seja em meio de cultura ou em um alimento. Após a coleta, os dados são modelos (modelos primários e secundários) e validados antes de serem inseridos no modelo terciário.



Figura 5. Esquema de desenvolvimento de um modelo terciário

Com a base de dados presentes nos modelos terciários é possível calcular a resposta microbiana em diversos ambientes, além de ser possível comparar estas respostas com as de outros micro-organismos nas mesmas condições. Os modelos terciários também podem ser utilizados para treinamentos visando-se demonstrar, por exemplo, a importância da manutenção de determinados alimentos sob condições de refrigeração, além de poderem ser usados para determinação de cinética de multiplicação, inativação, modelagem multiplica/não multiplica. Na Tabela 1, apresenta-se uma breve descrição de alguns modelos terciários, bases de dados e suplementos (i.e. GinaFit e DmFit) disponíveis para uso e aplicação em microbiologia preditiva. (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005; TAMPLIN; BARANYI; PAOLI, 2003).

O Pathogen Modeling Program (PMP) é o modelo terciário mais difundido juntamente com o Combase Predictor. O PMP foi desenvolvido no início dos anos 90 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). A sua primeira aplicação foi para a predição do comportamento de Listeria monocytogenes em carnes curadas. Os dados inseridos nesse programa, permitem ao usuário avaliar o comportamento deste patógeno em diferentes concentrações de nitrito de sódio combinado com variações no pH, concentração de sal, temperatura e atmosfera modificada. Atualmente o programa está na sétima versão e pode ser utilizado gratuitamente (vide Tabela 1). O PMP é um software voltado para bactérias patogênicas com dados sobre inativação, sobrevivência, multiplicação e modelos de probabilidade. A principal característica desse software é a utilização da equação de Gompertz como modelo primário. Para a utilização do PMP é necessário selecionar os fatores ambientais, as faixas desejadas e o micro-organismo. O programa retorna com uma estimativa do comportamento microbiano e a representação gráfica dos parâmetros estimados (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013).
Software	Link para acesso	Descrição
Baseline	www.baselineapp.com	Simula a multiplicação e a inativação de 5 patógenos em diferentes matrizes alimentares
ComBase	www.combase.cc	Base de dados com informações do comportamento microbiano em meio de cultura e matrizes alimentares
Dairy Products Safety Predictor	www.aqr.maisondulait.fr	Software comercial que simula modelos de avaliação quantitativa de risco microbiológico para um micro-organismo específico e um produto lácteo específico. É possível simular diferentes cenários.
DMFit	http://www.combase.cc/index.php/en/tools	Suplemento do Excel com modelos de Baranyi, Gompertz e Logístico para ajuste de dados experimentais de curvas de multiplicação
FDA-Risk	https://irisk.foodrisk.org	Sistema online projetado para analisar dados relativos a riscos microbianos e químicos em alimentos. Para a avaliação de risco nessa plataforma é necessário incluir dados relativos ao consumo, processamento e preparação do alimento. Com essas informações é possível estimar o risco associado ao consumo do alimento.
Food Spoilage Safety Predictor	http://fssp.food.dtu.dk	Predição de patógenos e deteriorantes em produtos marinhos e derivados.
GinaFIt	http://cit.kuleuven.be/biotec/ginafit.php	Suplemento do Microsoft Excel com modelos lineares e não-lineares para ajustes de dados experimentais de curvas de inativação
GroPIN	http://www.aua.gr/psomas/gropin/	Base de dados com 66 micro-organismos, simula o comportamento microbiano (multiplicação e inativação) em diferentes matrizes alimentares. É possível inserir novos modelos nesse software

Tabela 1	Contin	uação
----------	--------	-------

Software	Link para acesso	Descrição
Listeria Meat Model	www.cpmf2.be	Software comercial que simula o comportamento de Listeria em produtos cárneos
MicroHibro	www.microhibro.com	Composto por 3 módulos; Simulação do comportamento de 6 micro-organismos em matrizes alimentares; Simula a interface multiplica/não- multiplica dos micro-organismos; Possui um módulo de avaliação de risco e avaliação sensitiva dos parâmetros gerados pelo modelo.
Microbial Responses Viewer (MRV)	http://mrviewer.info/	Interface de modelos multiplica/não multiplica baseado na base de dados do Combase.
PMM - Lab	https://sourceforge.net/projects/pmmlab/	Software que simula o comportamento microbiano em diferentes matrizes alimentares, as informações iniciais para ajuste do modelo devem ser fornecidas pelo usuário.
Pathogen Modeling Program (PMP) on line	http://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx	Base de dados para predição do comportamento microbiano em diferentes condições ambientais em meios de cultura e matrizes alimentares
Prediction of Microbial Safety in Meat Products	http://dmripredict.dk	Simulação do comportamento de 4 patógenos em carnes e produtos à base de carne.
Symprevius	http://symprevius.eu/en/	Software comercial que simula o comportamento microbiano de 6 patógenos e 13 deteriorantes em matrizes alimentares. A simulação pode ser em condições dinâmicas ou estáticas

Adaptado de Tenenhaus-Aziza & Ellouze (TENENHAUS-AZIZA; ELLOUZE, 2015)

### 1.5. HETEROGENEIDADE NOS PARÂMETROS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA

A quantificação da variabilidade e da incerteza vem ganhando atenção nos últimos anos, porque representa de forma mais realística a presença e o comportamento dos micro-organismos nos alimentos. A negligência desses dois parâmetros pode resultar em super ou subestimação de um risco associado ao consumo de um alimento (DEN BESTEN; ARYANI; *et al.*, 2017). Na microbiologia preditiva a incerteza pode estar relacionada com as técnicas e com metodologias aplicadas para a realização das medidas, já a variabilidade é a representação da heterogeneidade biológica, como as diferenças genotípicas e fenotípicas das cepas. Ou ainda, essa heterogeneidade, pode estar relacionada com a presença de subpopulações sensíveis e resistentes. O nível de variação pode ser medido utilizando o desvio padrão, coeficiente de variação (CV) e o erro quadrático médio (RMSE). (ARYANI *et al.*, 2015; KOUTSOUMANIS; LIANOU, 2013). Essas medidas podem comparar a dispersão dos dados e serem utilizadas para expressar e interpretar a variabilidade.

A quantificação da variabilidade biológica para micro-organismos patogênicos e deteriorantes pode melhorar a predição dos dados de sobrevivência e inativação em alimentos. Os modelos estocásticos incorporam variabilidades inerentes ao próprio sistema através do uso de distribuições estatísticas. As distribuições estatísticas de probabilidade (Poison, Beta, Log-Normal, Exponencial, Gama, Binomial, etc.) são as mais utilizadas para descrever tendências de um evento e para incorporar a variabilidade em modelos (MEMBRÉ; VALDRAMIDIS, 2016). As variáveis e eventos considerados na construção de um modelo podem ser caracterizadas por propriedades como variabilidade e incerteza. A descrição adequada da variabilidade e incerteza tem enorme relevância para a estimativa final do risco. Variabilidade pode ser definida como a variação natural do sistema alvo ou população (diferenças especiais, temporais ou interindividuais), enquanto a incerteza é a falta de conhecimento sobre o sistema ou população, a consequência de limitações analíticas ou tecnológicas. Portanto, a incerteza pode ser reduzida aumentando as observações e medições no sistema ou a melhoria do método analítico, dentre outros aspectos. Por sua vez, a variabilidade não pode ser eliminada uma vez que é uma propriedade do sistema ou população sob estudo. (LAMMERDING; MCKELLAR, 2003).

### 1.6. OBJETIVOS E ESTRATÉGIA DE TRABALHO

Esta tese buscou quantificar os efeitos da operação unitária de secagem por atomização na variabilidade na sobrevivência de esporos de *B. cereus* em leite em pó. Diversos modelos usados em microbiologia preditiva propõem a quantificar o comportamento microbiano a partir de uma abordagem determinística. No entanto, a variabilidade é um fator fundamental, para tornar as predições mais realísticas:

Na revisão de literatura desta tese foram abordados conceitos referentes ao microorganismos em estudo, o *B.cereus*, à operação unitária de secagem por atomização, à microbiologia preditiva e à heterogeneidade no comportamento microbiano. Estes conceitos foram fundamentais para a elaboração dos capítulos 2, 3 e 4.

No capítulo 2 foi caracterizada a variabilidade de 12 cepas de *B. cereus* com relação à sobrevivência ao processo de *spray drying*. Como estratégia de trabalho primeiro realizou-se diversos ensaios avaliando o efeito do *spray drying* na sobrevivência de *B. cereus*. A partir do número de reduções decimais ( $\gamma$ ) causados pela secagem, foi possível separar 3 grupos de cepas com diferentes perfis de sobrevivência ao processo de *spray drying*. Para inferir o valor do D do processo de secagem foi realizado uma busca na literatura que resultou na aplicação de uma distribuição estatística para determinar os valores médios do tempo de residência da partícula na câmara de secagem. Além disso, buscou-se caracterizar os grupos de proteínas pudessem apresentar as diferenças observadas. Esta parte do trabalho está sendo feita em colaboração com a FCF-RP/USP e está fase de finalização.

No capítulo 3, uma outra estratégia foi utilizada para compreender os efeitos de diferentes condições de aquecimento (calor seco e calor úmido) e em diferentes matrizes na sobrevivência de esporos de *B.cereus*. O objetivo desta parte foi mostrar como os parâmetros determinados em diferentes condições de aquecimento não devem ser extrapolados para outros sistemas.

No capítulo 4, a estratégia de trabalho foi verificar a influência de diferentes estresses subletais, antes da secagem por atomização, na sobrevivência dos esporos de *B. cereus* ao processo de *spray drying*. Para tanto, aplicou-se 4 condições distintas de estresses subletais, combinando condições de calor e frio. Além disso, os pós foram estocados por 180 dias para avaliar a sobrevivência dos esporos após o processo de secagem por atomização.

### 1.7. REFERÊNCIAS

ABHYANKAR, W. et al. Reinforcement of *Bacillus subtilis* spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation. *Food Microbiology*, v. 45, n. 19, p. 54–62, 2011. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.007">http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.007</a>>.

ADHIKARI, B. et al. Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. *Journal of Food Engineering*, v. 94, n. 2, p. 144–153, set. 2009. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409000363">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409000363</a>>.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; ISHWARYA, P. Introduction to spray drying. In: ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; ISHWARYA, P. (Org.). . *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*. 1st. ed. Chicago: Willey, 2015. .

ARYANI, D. C. et al. Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 208, p. 19–29, set. 2015. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515300040">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515300040</a>>.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, n. 3–4, p. 277–294, nov. 1994. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160594901570">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160594901570</a>>. Acesso em: 29 abr. 2017.

BECKER, H. et al. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 1–15, 1994.

BENNETT, R. W.; TALLENT, S. M.; HAIT, J. M. *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* Toxins. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. [S.l.]: American Public Health Association, 2015. Disponível em: <http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/MBEF.0222.036>.

BERNAERTS, K. et al. Concepts and tools for predictive modeling of microbial dynamics. *Journal of food protection*, v. 67, n. 9, p. 2041–2052, 2004.

BEUCHAT, L. R. et al. Low–Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, v. 76, n. 1, p. 150–172, 2013. Disponível em: <a href="http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-12-211">http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-12-211</a>.

BHANDARI, B. R.; PATEL, K. C.; CHEN, X. D. Spray drying of food materials - process and product characteristics. In: CHEN, X. D.; MUJUMDAR, A. S. (Org.). *Drying Technologies in Food Processing*. 1st. ed. [S.l.]: Blackwell Publishung, 2008. p. 113–159.

BIRCHAL, V. S.; PASSOS, M. L. Modeling and simulation of milk emulsion drying in spray dryers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n. 2, p. 293–302, 2005.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, NULL, v. 99, n. 2, p. 575–586, fev. 2010. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916303926">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916303926</a>>. Acesso em: 2 mar. 2017.

CAPPUYNS, A.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. M. Modelling microbial inactivation kinetics: primary models. In: VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. M. (Org.). . *Progress on Quantitative Approaches of Thermal Food Processing*. [S.1.]: Nova Science Publishers, 2012.

CARLIN, F. Origin of bacterial spores contaminating foods. Food Microbiology, v. 28, n. 2, p.177–182,abr.2011.Disponívelem:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010001838>. Acesso em: 14 mar. 2017.

CEUPPENS, S.; BOON, N.; UYTTENDAELE, M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 84, n. 3, p. 433–450, 2013.

CERF, O. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 42, n. 1, p. 1–19, 1977.

CHEN, X. Food drying fundamentals. In: CHEN, X. D.; ARUN S. MUJUMDAR (Org.). *Drying Technologies in Food Processing*. London: Blackwell Publishing, 2008. p. 1–54

DEN BESTEN, H. M. W.; ARYANI, D. C.; et al. Microbial variability in growth and heat resistance of a pathogen and a spoiler: All variabilities are equal but some are more equal than others. *International Journal of Food Microbiology*, v. 240, p. 24–31, 2017. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.025">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.025</a>>.

DEN BESTEN, H. M. W.; BERENDSEN, E. M.; et al. Two complementary approaches toquantify variability in heat resistance of spores of Bacillus subtilis. International Journal ofFoodMicrobiology,2017.Disponívelem:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160517301733>.

DENS, E. J.; VAN IMPE, J. F. On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 247–260, mar. 2001. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004724">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004724</a>>.

DOLAN, K. et al. Thermal processing and kinetic modeling of inactivation. In: BAKALIS, S.;KNOERZER, K.; FRYER, P. J. (Org.). . Modeling Food Processing Operations. Cambridge:Elsevier,2015.p.37–66.Disponívelem:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782422846000027>.

GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Model for Combined Effects of Temperature, pH and Water Activity on Thermal Inactivation of *Bacillus cereus* Spores. *Journal of Food Science*, v. 63, n. 5, p. 887–889, 1998.

GALPERIN, M. Y. Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*, v. 1, n. 2, p. 1–15, 27 dez. 2013. Disponível em: <a href="http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012">http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012</a>.

GEERAERD, A. H.; HERREMANS, C. H.; VAN IMPE, J. F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 185–209, 2000.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, n. 1, p. 95–105, jun. 2005. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160505000073">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160505000073</a>>.

GOPAL, N. et al. The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, dez. 2015.

GRANGER, A. C. et al. Effects of Mn and Fe levels on *Bacillus subtilis* spore resistance and effects of Mn2+, other divalent cations, orthophosphate, and dipicolinic acid on protein resistance to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 1, p. 32–40, 2011.

HEYNDRICKX, M. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. Applied and Environmental Soil Science, v. 2011, p. 1–11, 2011. Disponível em: <a href="http://www.hindawi.com/journals/aess/2011/561975/">http://www.hindawi.com/journals/aess/2011/561975/</a>>.

HUANG, S. et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 63, p. 1–17, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416303247>. Acesso em: 8 maio 2017.

HUSMARK, U.; RÖNNER, U. Adhesion of *Bacillus cereus* spores to different solid surfaces: cleaned or conditioned with various food agents. Biofouling: *The journal of Bioadhesion and Biofilm research*, v. 7, n. 1, p. 57–65, 1993.

IN'T VELD, P.; SOENTORO, P.; NOTERMANS, S. Properties of spores in reference materials prepared from artificially contaminated spray dried milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 23–36, out. 1993. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016816059390057N">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016816059390057N</a>>.

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive Microbiology: A Review. *Biocontrol Science*, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2003. Disponível em: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bio1996/8.1?from=CrossRef>.

JOHNSON, E. A. Microbial Adaptation and Survival in Foods. In: YOUSEF, A. E.; JUNEJA,V. K. (Org.). *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. Boca Raton: [s.n.], 2003.

KOCA, N.; ERBAY, Z.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Effects of spray-drying conditions on the chemical, physical, and sensory properties of cheese powder. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 5, p. 2934–43, 2015. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021500185X">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021500185X</a>>.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 2, p. 189–198, 2000.

KOUTSOUMANIS, K. P.; LIANOU, A. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 7, p. 2294–2301, 2013.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, v. 69, p. 20–29, 2016a. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516301815>. Acesso em: 23 abr. 2017. KUMARI, S.; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, v. 69, p. 20–29, nov. 2016b. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516301815>. Acesso em: 3 mar. 2017.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group from various marketed dairy products in India. *Dairy Science and Technology*, v. 94, n. 5, p. 483–497, 2014.

LAMMERDING, A.; MCKELLAR, R. Predictive Microbiology In Quantitative Risk Assessment. In: MCKELLAR, R.; LU, X. (Org.). . *Modeling Microbial Responses in Foods*. Boca Raton: CRC, 2003. Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch8>.

LANG, E. et al. Modelling the heat inactivation of foodborne pathogens in milk powder: high relevance of the substrate water activity. *Food Research International*, 2017.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Evaluation of the strain variability of *Salmonella* Enterica acid and heat resistance. *Food Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 259–267, 2013. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.009</a>>.

LICARI, J. J. *Salmonella* Survival During Spray Drying and Subsequent Handling of Skimmilk Powder. II. Effects of Drying Conditions. *Journal of Dairy Science*, v. 53, n. 7, p. 871–876, 1970. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?\_ob=GatewayURL&\_method=citationSearch&\_urlV ersion=4&\_origin=EXLIBMETA&\_version=1&\_piikey=S0022-0302(70)86310-X&md5=7fb43bd292fc79134b4c962db504f4ce>.

LOBACZ, A.; KOWALIK, J. A predictive model for *Listeria monocytogenes* in UHT dairy products with various fat content during cold storage. *Journal of Food Safety*, v. 35, n. 1, p. 119–127, 2015.

LUU-THI, H.; KHADKA, D. B.; MICHIELS, C. W. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 189, p. 183–188, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.027>.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* Spores During Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk\r10.3168/jds.2006-754.

Journal of Dairy Science, v. 90, n. 6, p. 2745–2754, 2007. Disponível em: <a href="http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/90/6/2745">http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/90/6/2745</a>>.

MAJED, R. et al. Bacillus cereus Biofilms-same, only different. Frontiers in Microbiology, v. 7, n. JUL, p. 1–16, 2016.

MARKS, B. P. Status of Microbial Modeling in Food Process Models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 7, n. 1, p. 137–143, jan. 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2007.00032.x>.

MARTINEZ, R. C. R. et al. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT - Food Science and Technology*, v. 68, 2016.

MAZAS, M. et al. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *International Journal of Food Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 61–67, 1999.

MCKELLAR, R.; LU, X. Primary Models. [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <a href="http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch2">http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch2</a>>.

MCMEEKIN, T. et al. Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates? *Food Control*, v. 29, n. 2, p. 290–299, 2013.

MCMEEKIN, T. A. et al. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, v. 73, n. 2–3, p. 395–407, mar. 2002. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006638">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006638</a>>.

MEMBRÉ, J.-M.; VALDRAMIDIS, V. P. *Modeling Food Microbiology*. 1st. ed. London: Elsevier, 2016.

MILLER, R. A. et al. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 8492–8504, 2015.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of food technology*, v. 3, p. 41–51, 2000.

NICHOLSON, W. L. et al. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial andextraterrestrial environments. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 64, n.3,p.548–72,2000.Disponívelem:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99004&tool=pmcentrez&rendert ype=abstract>.

OKINAKA, R. T.; KEIM, P. The Phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Microbiology spectrum*, p. 1–12, 2016.

OWUSU-KWARTENG, J. et al. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 65, 2017. Disponível em: <a href="http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0975-9">http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0975-9</a>>.

PEÑA, W. E. L. et al. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *International Dairy Journal*, v. 34, n. 1, 2014.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. Nutrition, v. 30, n.6,p.619–627,jun.2014.Disponívelem:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900713004607>.

PÉREZ-CHABELA, M. L. et al. Effect of Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters Properties. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, n. 6, p. 1505–1515, 27 jun. 2013. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/s11947-012-0865-y">http://link.springer.com/10.1007/s11947-012-0865-y</a>.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A. *Predictive Microbiology in Foods*. New York, NY: Springer New York, 2013. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5520-2">http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5520-2</a>>.

PERIAGO, P. M. et al. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of Bacillus cereus ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 7, p. 3486–3495, 1 jul. 2002. Disponível em: <a href="http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.68.7.3486-3495.2002">http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.68.7.3486-3495.2002</a>>.

PFLUG, I. J. *Microbiology and Engineering of Sterilization Process*. 10th. ed. Minneapolis: University of Minnesota, Environmental Sterilization Laboratory, 1999.

QUIGLEY, L. et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 5, p. 664–698, set. 2013. Disponível em: <a href="https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12030">https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12030</a>>.

RASCH, M. Experimental Design and Data Collection. [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <a href="http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch1">http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch1</a>>.

RATKOWSKY, D. A. et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, v. 154, n. 3, p. 1222–1226, 1983.

REYES, J. E.; BASTÍAS, J. M.; et al. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 1–6, 2007. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002006000992">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002006000992</a>. Acesso em: 27 abr. 2017.

ROSS, T.; DALGAARD, P. Secondary Models. In: *Modeling Microbial Responses in Foods*, p. 63–150, 2004.

SADIQ, F. A. et al. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, v. 238, p. 193–201, 2016. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009</a>>.

SANCHEZ-SALAS, J. L. et al. Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis* sporulation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 19, p. 6746–6754, 2011.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, n. 3, p. 514–525, 2006.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, v. 65, p. 49–67, 2017. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416306355">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416306355</a>>.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 2, p. 587–597, fev. 2010. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916304129">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916304129</a>. Acesso em: 2 mar. 2017.

SUNDE, E. P. et al. The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National* Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, n. 46, p. 19334–9, 2009. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com.proxy.uba.uva.nl:2048/full\_record.do?product=UA&searc h\_mode=GeneralSearch&qid=22&SID=N2SxqNckHIicXUzKxZE&page=2&doc=12>.

TAMPLIN, M.; BARANYI, J.; PAOLI, G. Software Programs to Increase The Utility Of Predictive Microbiology Information\*. [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <a href="http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch6">http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch6</a>>.

TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology*, v. 45, n. PB, p. 290–299, 2015. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.026">http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.026</a>>.

TIBURSKI, J. H. et al. Water Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance. *Food Biophysics*, v. 9, n. 1, p. 10–19, 2014. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/s11483-013-9312-5">http://link.springer.com/10.1007/s11483-013-9312-5</a>>.

VERMEULEN, A. et al. Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, n. 2, p. 83–89, 2009. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.038">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.038</a>>.

WELLS-BENNIK, M. H. J. et al. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 7, n. 1, p. 457–482, 2016. Disponível em: <a href="http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-041715-033144">http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-041715-033144</a>>.

WISNIEWSKI, R. Spray Drying Technology. *International Conference on Environmental Systems*, n. July, p. 1–46, 2015.

WU, W. D. et al. Towards spray drying of high solids dairy liquid: Effects of feed solid content on particle structure and functionality. *Journal of Food Engineering*, v. 123, p. 130–135, 2014. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.013">http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.013</a>>.

ZHANG, W.; LU, Z. Phylogenomic evaluation of members above the species level within the phylum F irmicutes based on conserved proteins. Environmental *Microbiology Reports*, v. 7, n. 2, p. 273–281, abr. 2015. Disponível em: <a href="http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12241">http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12241</a>.

ZHANG, Z. et al. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 93, n. 2, p. 99–109, 2012.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503006081>. Acesso em: 10 abr. 2017.

ZOCCAL, R. Conjuntura atual da produção de leite no mundo. Disponível em: <a href="http://www.baldebranco.com.br/conjuntura-atual-da-producao-de-leite-no-mundo/">http://www.baldebranco.com.br/conjuntura-atual-da-producao-de-leite-no-mundo/</a>. Acesso em: 6 jun. 2017.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of Bacterial Growth Function of Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 1094–1101, 1991.

### CAPÍTULO 2

# Sobrevivência e análise proteômica de esporos de *Bacillus cereus* submetidos ao processo de secagem de leite integral por *spray drying*

Artigo formatado conforme normas de submissão da revista: "Applied and Environmental Microbiology"

1	Sobrevivência e análise proteômica de esporos de Bacillus cereus submetidos
2	ao processo de secagem de leite integral por <i>spray drying</i>
3	
4	Verônica Ortiz Alvarenga <sup>1</sup> , Guilherme Brancini <sup>2</sup> , Arthur Kael da Pia Rodrigues <sup>1</sup> , Fernanda
5	Bovo Campgnollo <sup>1</sup> , Gilberto Úbida Leite Braga <sup>2</sup> , Miriam Dupas Hubinger <sup>3</sup> , Anderson S.
6	Sant'Ana <sup>1#</sup>
7	
8	<sup>1</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade
9	Estadual de Campinas, Brasil
10	<sup>2</sup> Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e Bromatologia, Faculdade de Ciências
11	Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
12	<sup>3</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
13	Universidade Estadual de Campinas, Brasil
14	
15	Running Title: Sobrevivência de esporos de Bacillus cereus à secagem por spray drying
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	#Corresponding author: Prof. A.S.Sant'Ana: and@unicamp.br Rua Monteiro Lobato, 80.
23	Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brazil. Phone: +55(19)
24	3521-2174.

### 25 **RESUMO**

26 O objetivo desse estudo foi caracterizar a variabilidade da sobrevivência de 12 27 cepas de B. cereus ao processo de secagem por spray drying. Esporos de B. cereus inoculados 28 em leite integral  $(7,2 \pm 0,2 \log_{10} \text{ esp/g} \text{ de massa seca})$  foram submetidas a secagem por spray drying (190 °C ± 2 °C; vazão do ar de secagem 84 m<sup>3</sup>/ h; vazão de alimentação 7 × 10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>/ h, 29 30 vazão do ar comprimido 2,4 m<sup>3</sup>/ h; pressão do ar comprimido 0,25 Mpa e Temperatura de saída 31 do ar de 110 °C ± 5 °C), totalizando 12 experimentos independentes que foram repetidos 3 32 vezes. A contagem de esporos foi determinada em agar Manitol Gema de Ovo Polmixina, antes 33 e após cada processo de secagem, baseada na massa seca do leite integral e do leite em pó, 34 sendo calculado o número de reduções decimais ( $\gamma = \log N_0 - \log N_f$ ) causado pelo processo de 35 secagem por spray drying. Os valores de  $\gamma$  variaram de 1,0 a 4,7 log<sub>10</sub> esporos/g massa seca, 36 apresentando um elevado coeficiente de variação (CV) de 46,1% entre as 12 cepas avaliadas. 37 Dentre as 12 cepas estudadas, 3 (uma sensível, uma intermediária e uma resistente) foram 38 selecionadas para o estudo do proteoma, sendo observada uma diferenca na densidade dos *spots* 39 de proteínas das cepas. Os resultados do presente estudo demonstram uma grande variabilidade 40 dos esporos de B. cereus ao processo de secagem. A determinação dos efeitos desta operação 41 unitária sobre esporos de B. cereus é de suma importância para que as indústrias possam adotar 42 medidas que visem garantir a qualidade e segurança de produtos desidratados. 43

44 Palavras-chave: heterogeneidade, parâmetros de inativação, microbiologia
45 quantitativa, patógeno

### 46 INTRODUÇÃO

47 O grupo Bacillus cereus ou B. cereus sensu lato é um conjunto de espécies que 48 apresenta elevado grau de similaridade genotípica e fenotípica, sendo composto por *B. cereus*, 49 B. thuringiensis, B. anthracis, B. mycoides. B. pseudomycoides, B. cytotoxicous e B. 50 weihenstephanensis (1, 2). B. cereus é um bastonete Gram-positivo, móvel e formador de 51 esporos, estando amplamente distribuído na natureza e adaptado ao trato gastrointestinal de 52 animais (1, 3). Além do potencial patogênico, também é responsável pela produção de lipases 53 e proteases que causam coagulação, gelificação e amargor em produtos lácteos (1, 3, 4). 54 Espécies de Bacillus, incluindo B. cereus, são amplamente prevalentes na cadeia produtiva de 55 leites e derivados (1).

A principal fonte de contaminação de leite e derivados por *B. cereus* são fezes de animais, água e o solo (3, 5). Uma vez presente no leite (matéria-prima), os esporos de *B. cereus* podem ter acesso ao ambiente de processamento de produtos lácteos, onde podem persistir devido à capacidade de adesão e a formação de biofilme em superfícies, tubulações e equipamentos (3, 4, 6). Como resultado da sua prevalência na matéria-prima (7–9) e persistência no ambiente de processamento (10), há elevada incidência em produtos lácteos processados como leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó (11–16).

63 Diversos estudos reportam a incidência e contagem de B. cereus em leite 64 pasteurizado (15) e leite UHT (16). Todavia, estudos sobre a ocorrência de B. cereus em leite 65 em pó são escassos. Por exemplo, a incidência de *B. cereus* em leite em pó foi confirmada em amostras de 13 países (4, 12–14) e variou entre 0,3 a  $10^3$  esporos/g. A análise de 175 amostras 66 67 de leite em pó, provenientes do Chile, demonstrou uma incidência de 43% de B. cereus (contagem entre 3 e  $10^4$  esporos/g) (14). Além destas limitações, no melhor conhecimento dos 68 69 autores, inexistem dados sobre os efeitos do processo de secagem do leite por spray drying em 70 relação a sobrevivência de esporos de *B. cereus*. Durante a secagem do leite por atomização o 71 ar é aquecido entre 150 a 270 °C na entrada do processo (17, 18) e a gotícula tem contato com 72 ar quente entre 0,2 e 55 s (18–23) que normalmente culminam com a inativação da maior parte 73 dos micro-organismos, na forma vegetativa (24). Desta forma, os micro-organismos 74 esporulados tendem a dominar a microbiota de produtos desidratados, incluindo daqueles 75 obtidos por processos de spray drying (13, 25, 26). Apesar dos micro-organismos esporulados 76 apresentarem, intrinsicamente, elevada resistência ao calor (12), durante a secagem por sprav 77 drying, fenômenos associados à transferência de massa (redução de umidade) (17) podem

minimizar os efeitos a estrutura do esporo causados por altas temperaturas. A redução na umidade pode resultar numa maior sobrevivência dos esporos às elevadas temperaturas empregadas no processo de *spray drying* (27), o que implicará em contagens elevadas de esporos no produto seco. Por sua vez, a concentração de esporos bacterianos em leite em pó pode ser crítica considerando-se a ampla utilização deste produto como ingrediente em formulações de alimentos que serão processados/estocados sob condições diferentes e que serão consumidos por indivíduos com susceptibilidade variada à patógenos.

85 Embora o leite em pó não ofereça condições para a germinação de esporos de B. 86 *cereus*, guando este produto é reidratado para consumo ou utilizado na formulação de outros 87 alimentos, condições favoráveis para germinação e multiplicação de B. cereus podem ser fornecidas (14). Enquanto contagens de ~> $10^6$  UFC/g ou mL são associadas a surtos causados 88 89 por B. cereus (síndromes emética e diarreica) (28), o conhecimento da carga de esporos de 90 ingredientes a serem usados nas formulações de alimentos é capital para o desenho e garantia 91 da eficiência de processos térmicos (29). Desta forma, se torna evidente a importância de se 92 quantificar o efeito do processo de spray drying sobre os micro-organismos esporulados 93 presentes no leite. Apesar disso, devido à heterogeneidade associada a cepas e, até mesmo às 94 células individuais (30, 31), pode-se observar uma grande variabilidade na resistência térmica 95 dos esporos. A caracterização desta variabilidade é crítica para o desenho e controle de 96 processos na indústria de alimentos, pois sua desconsideração pode permitir a sobrevivência de 97 cepas mais resistentes e resultar na deterioração do produto ou na ocorrência de surtos (32, 33). 98 Considerando-se o exposto, o presente trabalho foi conduzido objetivando-se determinar a 99 variabilidade na sobrevivência de 12 cepas de B. cereus durante o processo de secagem por 100 spray drying de leite em pó integral. Além disso, objetivou-se caracterizar o perfil de proteínas 101 de 3 cepas para elucidar a diferença na sobrevivência dos esporos de B. cereus ao processo de 102 secagem por spray drying.

### 103 MATERIAL E MÉTODOS

104

### Cepas de <u>Bacillus cereus</u> e preparo das suspensões de esporos

Foram avaliadas 12 cepas de *B. cereus*, doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). As cepas utilizadas foram isoladas de alimentos como leite e produtos lácteos (n=5), derivados de cacau (n=2), produtos cárneos (n=1), refeição pronta (n=1), derivados de amido (n=2) e cepa padrão ATCC 14579 (n=1), utilizada como referência para processos térmicos. As culturas puras foram mantidas congeladas a -80 °C em caldo nutriente com glicerol 20% (p/p) até o momento do uso.

111 O preparo das suspensões de esporos foi realizado de acordo com Peña et al (6), 112 Pflug (34) e Martinez et al (35). Basicamente, as cepas de B. cereus foram inoculadas em caldo 113 Nutriente (Kasvi, Curitiba, Brasil) adicionado de sulfato de manganês (10 mg/ L) (Synth, 114 Diadema, Brasil) e incubadas a 30 °C por 24 h. Em seguida, 2 mL do crescimento de cada cepa 115 foi inoculado em garrafas de Roux contendo Agar Nutriente (Kasvi, Curitiba, Brasil) 116 adicionado de sulfato de manganês (10 mg/ L) (NA-SM). As garrafas de Roux contendo NA-117 SM foram incubadas a 30 °C por 30 dias. O processo de esporulação foi acompanhado pelo 118 exame microscópico com coloração com solução de verde de malaquita 5 % (Dinâmica, 119 Diadema, Brasil) e contra corada com solução de safranina 0,5 % (Dinâmica, Diadema, Brasil) 120 de acordo com o método de Wirts-Conklin (38). Quando aproximadamente 90% de esporos 121 foram observados no exame microscópico, procedeu-se a lavagem de cada suspensão com água 122 destilada estéril, seguindo-se centrifugação (1,500 × g por 20 min a 4°C) (Sorvall Legend XTR 123 Thermofischer, Waltham, EUA). A concentração de esporos em cada suspensão foi ajustada 124 através de ressuspensão em água destilada estéril, seguindo-se contagem após choque térmico (80 °C/ 30 min) em ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina [MYP] (Acumedia, Lansing, USA) 125 126 incubado à 30 °C por 48 h. As suspensões foram mantidas a -20 °C até o uso.

- 127
- 128

#### Preparo e inoculação do leite para o processo de secagem por spray drying

As amostras de leite pasteurizado integral [3.5% (v/v) gordura] foram utilizadas, porque os produtos lácteos concentrados e desidratados apresentam elevada carga de esporos (36). A operação unitária de secagem por atomização favorece a sobrevivência de microorganismos esporulados, pois a rápida desidratação preserva a estrutura do esporo (37). Os lotes de leite comerciais utilizados nos experimentos de secagem foram testados com relação à presença de esporos de *B. cereus* de acordo com a metodologia de Bennet, Tallent, Hait (38). As contagens de esporos de *B. cereus* nos lotes comerciais utilizados foram < 10 esporos/mL</li>
de leite.

Para o processo de secagem por spray drying, cada suspensão de esporos foi diluída
em PBS [tampão fosfato salino] (Dinâmica, Diadema, Brasil) e, em seguida, inoculou-se 500 g
de leite integral separadamente, com cada suspensão, na concentração de 7,2 (± 0,2) log<sub>10</sub>
esporos/g de massa seca.

141

142 Processos de secagem por spray drying Os experimentos foram realizados em um 143 spray dryer modelo SD 1.0 (LabMaq, Ribeirão Preto, Brasil) com capacidade nominal de 144 secagem de 1,0 L/ h, dimensões 1800 mm (altura com rodízios), 500 mm (largura), 800 mm 145 (comprimento). A dimensões da câmara de secagem foram 500 mm (comprimento) e 150 mm 146 (largura). O atomizador utilizado foi um conjunto atomizador em aço inox do tipo duplo fluido, 147 composto por um extensor, pela capa do bico atomizador e pelo bico atomizador de 1,2mm 148 (LabMaq, Ribeirão Preto, Brasil). Antes e após cada processo de secagem, o spray dryer 149 (câmara de secagem, bico atomizador, ciclone, tubulações e mangueiras) foi lavado, 150 higienizado e esterilizado (Figura S1 - Material Suplementar). O procedimento de lavagem 151 consistia na imersão em solução 1,0% (v/v) de detergente alcalino Divostar Quatro® (Diversey, 152 São Paulo, Brasil) por 30 min a 30 °C e enxágue com água. Em seguida, era realizada imersão 153 em solução 0,5% (v/v) de detergente ácido Divostar Pascal® (Diversey, São Paulo, Brasil) por 154 20 min a 30 °C sendo enxaguado com água novamente. Para a sanitização, o equipamento foi 155 imerso em solução 0,25% (v/v) de ácido peracético Divostar Forte® (Diversey, São Paulo, 156 Brasil) por 20 min. Após sanitização, o spray dryer (câmara de secagem, bico aspersor, ciclone, 157 tubulações e mangueiras) foi enxaguado com água, embrulhado com papel kraft puro [80 g/m<sup>2</sup>] 158 (Nossa Senhora do Líbano, São Paulo, Brasil), seguindo-se esterilização em autoclave a 121 °C 159 por 40 min. Outras medidas de segurança adotadas foram: instalação de um filtro na saída de 160 exaustão de ar do equipamento, antes da descarga do ar no ambiente; e alocação do equipamento 161 em uma sala fechada, a qual era limpa e desinfetada com cloreto de benzalcônio (Royal Marck, 162 Guarulhos, Brasil) 10% (v/v) antes e após cada processo.

163

Processos de secagem: A alimentação do secador foi realizada por uma bomba
 peristáltica (PS I, LabMaq, Ribeirão Preto, Brasil) com vazão máxima de 1,0 L/ h acoplada a
 uma mangueira de silicone [ø interno 2,38 mm, ø externo 5,56 mm, espessura da parede 1,58

167 mm] (Versilic SPX-50, Saint Gobain, Beaverton, EUA). Os parâmetros de secagem 168 empregados, simulando as condições industriais de secagem e considerando as limitações do 169 equipamento, foram: temperatura de entrada de ar (190 °C ± 2 °C), vazão do ar de secagem (84  $m^3/h$ ), vazão de alimentação (7 × 10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>/h), vazão do ar comprimido (2,4 m<sup>3</sup>/h), pressão do 170 171 ar comprimido (0,25 MPa) e temperatura de saída (110 °C ± 5 °C). As temperaturas de entrada 172 e de saída foram monitoradas ao logo do processo de secagem por um termopar (PT 100, 173 LabMaq, Ribeirão Preto, Brasil). O processo de secagem foi alimentado com 500 g de leite 174 integral a 20°C, inoculado com suspensão de esporos de B. cereus, acondicionado em frascos 175 reagentes com tampa de rosca, estéreis, com capacidade nominal para 500 mL (Borossilicato 176 3:3, Laborglass, São Paulo, Brasil) com um orifício de 5,6 mm na tampa para a inserção da 177 mangueira alimentadora do secador. O leite em pó foi coletado em frasco reagente com tampa 178 de rosca, estéril, com capacidade nominal de 250 mL (Borossilicato 3:3, Laborglass, São Paulo, 179 Brasil) acoplado a saída de rosca do ciclone. A massa de leite em pó coletado a cada processo 180 de secagem foi de aproximadamente  $23.8 \pm 3.9$  g. Os processos de secagem duravam em média 181 1 h, considerando o tempo necessário para atingir a condição de equilíbrio para temperatura, 182 temperatura de entrada de 190 °C estável por 15 minutos. O processo era considerado finalizado 183 quando todo o conteúdo de leite inoculado era secado, a partir desse momento o aquecimento 184 do ar de entrada era desligado e a aguardava-se a estabilização da temperatura do ar de saída 185 em 60 °C e, assim o secador era desligado e desmontado para limpeza e esterilização, conforme 186 procedimento descrito acima. Um total de 3 processos de secagem foram conduzidos para cada cepa estudada, totalizando 36 processos de secagem. Os experimentos controle consistiram de 187 188 dois processos de secagem utilizando leite não inoculado com esporos de B. cereus. O leite em 189 pó recuperado após cada processo de secagem foi analisado e determinada a concentração de 190 esporos de *B. cereus* por grama de leite em pó e posteriormente convertido para esporos / g de 191 massa seca. Além disso, o teor de sólidos das amostras foi determinado por balança de 192 infravermelho (Gehaka IV3100, São Paulo, Brasil). O teor de sólidos no leite integral antes do 193 processo de secagem foi de 10,7 g sólidos/100 g de sólidos e no leite em pó após o processo de 194 secagem foi de  $94.2 \pm 0.10$  g sólidos/100 g de sólidos

195 Enumeração de esporos de <u>Bacillus cereus</u> no leite antes e após a secagem: A
196 concentração de esporos de *B. cereus* no leite foi determinada antes e após cada processo de
197 secagem seguindo a metodologia adaptada de Bennet, Tallent, Hait (38). Antes do processo de
198 secagem, uma amostra de 10 g de leite (inoculado ou não, com cada cepa de *B. cereus*) era

199 retirada e submetida a choque térmico a 80 °C por 30 min (binômio tempo/ temperatura ótimo 200 para recuperar esporos antes do processo de secagem, de acordo com experimentos preliminares 201 não mostrados). Finalizado o processo de secagem, uma amostra contendo 1 g de leite em pó 202 era ressuspendida em 9 mL de tampão citrato de sódio (Dinâmica, Diadema, Brasil) e submetida 203 a choque térmico a 75 °C por 20 min (condição ótima para choque térmico visando a 204 recuperação de esporos após o processo de secagem, de acordo com experimentos preliminares 205 não mostrados). Após cada choque, eram preparadas diluições decimais seriadas em tampão 206 citrato de sódio (Dinâmica, Diadema, Brasil), realizado o plaqueamento em agar MYP [Manitol 207 Gema de Ovo Polimixina] (Acumedia, Lansing, USA) e incubação a 30 °C por 48 h. Eram 208 contadas colônias típicas, com as seguintes características, esféricas, planas, com coloração 209 rósea e com formação de halo de lecitinase. Após a contagem, 5 colônias com características 210 típicas foram selecionadas e submetidas à testes bioquímicos, como resistência a lisozima, 211 decomposição da tirosina e coloração de Gram conforme metodologia descrita por Bennett et 212 al. (38). Os resultados foram expressos em esporos por grama de leite e posteriormente 213 convertidos em esporos por grama de massa seca, baseado teor de sólidos na entrada e na saída 214 do processo de secagem.

215

216

Determinação do número de reduções decimais causadas pelo processo de 217 secagem por spray drying nas 12 cepas de Bacillus cereus: O número de reduções decimais 218  $(\gamma)$  causadas pelo processo de secagem por spray drying foi determinado para cada cepa, 219 considerando-se a concentração de esporos por massa seca de amostra, antes e após o processo 220 de secagem (Equação 1):

221

$$\gamma = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \tag{1}$$

222 Onde N<sub>0</sub>: contagem inicial de esporos por massa seca de leite integral (esporos/g 223 massa seca); N: contagem de esporos após o processo de spray drying por massa seca de 224 amostra (esporos/g massa seca).

225 A determinação da variabilidade entre o número de reduções decimais ( $\gamma$ ) das cepas 226 foi realizada utilizando-se o coeficiente de variação (CV), que mede a homogeneidade dos 227 dados analisados. Foi calculada a média do número de reduções decimais de três diferentes dias 228 experimentais para cada cepa na condição de secagem testada, temperatura de entrada de ar 229 (190 °C  $\pm$  2 °C), vazão do ar de secagem (84 m<sup>3</sup>/ h), vazão de alimentação (7 × 10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>/ h), 230 vazão do ar comprimido (2,4 m<sup>3</sup>/ h), pressão do ar comprimido (0,25 MPa) e temperatura de saída (110 °C ± 5 °C). Após a determinação do número de redução decimal para cada cepa,
distribuições estatísticas foram usadas para ajustar aos dados experimentais através do @Risk
6.0 para Excel (Palisade Corporation, Newfield, NY). As distribuições foram selecionadas com
base nos seguintes índices de ajustes: Qui-Quadrado (X<sup>2</sup>), Anderson – Darling (A-D) e
Kolmogorov – Smirnov (K-S) (32).

- 236
- 237

### 238 239

## Distribuição dos valores D para 12 diferentes cepas de B. cereus durante o processo de secagem por spray drying.

Para a estimativa do valor D durante o processo de secagem por spray drying, considerou-se o número de reduções obtidas e respectivas funções estatísticas ajustadas para cada cepa (Tabela 1) e a distribuição estatística do tempo de residência em processos de secagem por spray drying foram inseridos na Equação 2.

$$\gamma = -\frac{t}{D} \qquad (2)$$

Onde  $\gamma = log\left(\frac{N_0}{N}\right)$ ; N<sub>0</sub>: contagem inicial de esporos por massa seca de leite integral (esporos/g massa seca); N: contagem de esporos após o processo de spray drying por massa seca de amostra (esporos/g massa seca); t: distribuição do tempo de residência da partícula na câmara de secagem; D: tempo necessário para uma redução decimal da população de esporos.

249 A distribuição do tempo de residência das partículas em spray dryer de laboratório 250 é caracterizado por valores que variam entre 0,2 a 55s (18). Ainda que a distribuição do tempo 251 de residência das partículas sofra influência do volume e da geometria da câmara de secagem e 252 da vazão do ar de secagem, diversos autores relatam que a distribuição do tempo de residência 253 das partículas com diâmetro até 120 µm não ultrapassa 60s segundos em secadores de escala 254 de laboratório (17, 18, 23, 39). Portanto, utilizou-se a função BestFit do software @Risk para 255 o ajuste de uma distribuição estatística aos valores do tempo de residência obtidos na literatura. 256 Foi utilizada uma distribuição do tipo PERT que tem como parâmetros os valores mínimos, 257 mais provável e máximo, na qual os valores extremos não são tão enfatizados. (40). Como valor 258 mínimo foi utilizado 0,2 s, mais provável 6 s, conforme descrito por Schmitz-Schug (18) e valor 259 máximo 55 s.

Para o cálculo do valor D foi considerada a temperatura de 110 °C que é a
temperatura do ar de saída da câmara de secagem. Vale ressaltar, que apesar da temperatura de

262 operação do equipamento ser de 190 °C a temperatura de saída está relacionada com a 263 temperatura na qual a gota pode atingir no segundo estágio do processo de secagem e, está 264 relacionada com a inativação microbiana (41). As distribuições dos valores D para as 12 cepas 265 foram obtidas após 10.000 iterações. Escolheu-se fazer uma abordagem estocástica para 266 descrever quantitativamente a variabilidade na sobrevivência dos esporos de B. cereus ao 267 processo de spray drying. Foram simuladas distribuições para avaliar a densidade de 268 probabilidade do número de reduções decimais para o processo de secagem para cada cepa 269 avaliada. A Tabela 1 mostra as distribuições com melhor ajuste para o número de reduções de 270 cada cepa. As distribuições para avaliar a densidade de probabilidade do número de reduções 271 decimais para o processo de secagem para cada cepa avaliada, sendo que a distribuição com 272 melhor ajuste foi a Exponencial em todos os casos. Além disso, mostra os valores de RiskShift 273 para estimar os limiares que modificam o valor do número de reduções médio para cada uma das cepas. 274

275 276 Tabela 1. Distribuições estatísticas dos dados de reduções decimais causados pelo processo de secagem por *spray drying* sobre esporos de 12 diferentes cepas de *Bacillus cereus*.

Сера	Distribuição	
432	RiskExpon(0.2881;RiskShift (3.3634))	
436	RiskExpon(0.082626; RiskShift (0.970405))	
511	RiskExpon(0.32882; RiskShift (3.07385))	
512	RiskExpon(0.21247;RiskShift(3.47433))	
540	RiskExpon(0.31726;RiskShift(4.31092))	
В3	RiskExpon(0.11535;RiskShift(1.35442))	
B18	RiskExpon(0.18051;RiskShift(1.71829))	
B51	RiskExpon(0.24129;RiskShift(1.19766))	
B63	RiskExpon(0.13008;RiskShift(2.20418))	
B86	RiskExpon(0.14631;RiskShift(1.822337))	
B94	RiskExpon(0.22235;RiskShift(1.04092))	
ATCCC 14579	RiskExpon(0.0844160;RiskShift(3.812838))	

277

278

279

A Tabela 2 apresenta a simulação do modelo utilizado para determinação do valor
D das 12 cepas de *B. cereus* submetidas ao processo de secagem por spray drying a 190 °C para
a produção de leite em pó.

283

284Tabela 2. Simulação do modelo utilizando-se o software @Risk para inativação285térmica de esporos de *Bacillus cereus* durante o processo de secagem por spray drying para286produção de leite em pó.

Parâmetro <sup>1</sup>	<b>Output</b> <sup>2</sup>	<b>Fórmula</b> <sup>3</sup>
Tempo de residência (s)	13,2	=RiskPert(0,2, 6, 55)
Número de reduções	3,70	=RiskExpon(3,70)
Valor D (s)	3,59	=RiskOutput()+B2/B3

<sup>1</sup> Parâmetro: refere-se aos parâmetros analisados para se determinar o tempo de
 residência mais provável; <sup>2</sup>Outputs: refere-se aos valores mais prováveis de cada parâmetro;
 <sup>3</sup>Fórmula: refere-se às funções que determinarão as distribuições de valores prováveis para cada
 parâmetro.

291

292

### Proteômica de esporos de Bacillus cereus

293 *Cepas* 

A partir da diferença na sobrevivência ao processo de secagem por atomização, definiu-se três grupos (um resistente, um intermediário e um sensível). Desses grupos foram selecionadas 3 cepas (436, 540 e B63) para avaliação do proteoma. O objetivo foi caracterizar a variabilidade da expressão de proteínas dos esporos. As análises de proteômica foram conduzidas a partir das suspensões de esporos que foram mantidas a -20 °C até a etapa de extração e purificação das proteínas.

300

### Extração e purificação de proteína total

A cada tubo contendo esporos de *B. cereus* (10.0 log10/mL) foram adicionados 500  $\mu$ L de solução de extração [ureia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4% e inibidor de protease (complete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim, Alemanha)] e 500  $\mu$ L de pérolas de vidro (425-600  $\mu$ m, Sigma, Darmstadt, Alemanha). Os esporos foram lisados por 5 ciclos compostos de 1 min de agitação em vortex e 5 min de incubação no gelo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1000 × g por 5 min e 4 °C. O sobrenadante, contendo as proteínas extraídas, foi coletado e purificado pelo protocolo descrito em Wessel e Flügge (42). As proteínas purificadas foram então solubilizadas em 15 µL da solução de extração descrita acima
e quantificadas usando-se o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Saint Louis, EUA). Após a
quantificação, as soluções de proteína foram utilizadas imediatamente ou armazenadas em
freezer a -80 °C.

- 312
- 313

### Eletroforese Bidimensional (2-DE)

314 Para a focalização isoelétrica, a concentração de proteína foi ajustada para 20 µg 315 em 250 µL de solução de reidratação [ureia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, IPG buffer 3-10 316 NL (GE Healthcare) 0,5% (v/v), ditiotreitol (DTT, Sigma) 40 mM, azul de bromofenol (Sigma) 317 0,002% e inibidor de protease (Roche)]. Esse volume foi então aplicado a strips de 13 cm (3-318 11 NL, GE Healthcare), que foram reidratadas por 16-18 h. A focalização foi realizada em 319 equipamento IPGphor 3 (GE Healthcare), de acordo com o seguinte protocolo (43): 500 V 320 (atinge e mantém) até 0,5 kVh, 1000 V (gradiente) até 0,8 kVh, 8000 V (gradiente) até 11,3 321 kVh e 8000 V (atinge e mantém) até que um total de 25 kVh fosse atingido. Após a focalização, 322 as strips foram equilibradas em solução contendo Tris-HCl pH 8,8 75 mM, ureia 6M, glicerol 323 30%, SDS 2% e DTT 65 mM por 15 min. O mesmo passo foi repetido, porém substituindo-se 324 DTT por iodoacetamida 135 mM. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi 325 realizada em aparelho SE 600 Ruby (GE Healthcare) usando-se géis a 12,5% em tampão Tris-326 glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 1%). Marcadores de massa molecular (GE 327 Healthcare) foram adicionados em todos os géis. Os géis foram feitos em tripilicata.

- 328
- 329

### Coloração dos géis e análise de imagem

330 Após a eletroforese SDS-PAGE, os géis foram imediatamente fixados em solução 331 contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) por no mínimo 1 h. Essa solução foi 332 então decantada e substituída por metanol 5% (v/v) e os géis foram incubados por 15 min. A 333 solução foi decantada novamente e os géis foram lavados com água deionizada por três vezes, 334 sendo 5 min cada lavagem. Em seguida, os géis foram expostos a uma solução de tiossulfato 335 de sódio (Sigma) 0,02% (p/v) por 3 min, lavados novamente com água deionizada por 30 s e 336 incubados em solução 0,2% (p/v) de nitrato de prata (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 23 337 min. Os géis foram novamente lavados com água deionizada por 30 s e, finalmente, a revelação 338 foi feita em solução contendo carbonato de sódio (Sigma) 3% (p/v), 2% (v/v) de solução de 339 tiossulfato de sódio 0,02% (p/v) e 0,05% (v/v) de formaldeído 37% (Sigma). A reação de revelação foi interrompida pela adição de EDTA 1,4% (p/v) por 10 min. Os géis foram lavados
uma última vez com água deionizada para remoção do EDTA. O procedimento de coloração
dos géis com nitrato de prata foi baseado no protocolo Short silver nitrate staining descrito por
Chevallet; Luche; Rabilloudo (44). Os géis corados foram escaneados utilizando-se o
ImageScanner III (GE Healthcare) e a leitura feita no software Labscan 6.0 (GE Healthcare).

A análise de proteômica da cepa 436, bem como, a identificação dos spots de
proteínas, estão em fase de finalização no Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e
Bromatologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo sob supervisão do prof. Dr. Gilberto Úbida Braga Leite.

349

350

### Análises estatísticas

As diferenças estatísticas entre as cepas com relação ao número de reduções decimais ( $\gamma$ ) foram comparados por ANOVA e pelo teste de Tukey (p = 0,05) utilizando-se o Software R (Versão 3.3.1) (The R Foundation for Statistical Computing Viena, Áustria). Para a avaliação das diferenças estatísticas entre os valores D, foi utilizado o teste de WilCox (p = 0,05) no software R.

356 Para a análise de agrupamento foi utilizado o algoritmo de Ward do pacote APE do
357 software R, determinando-se a distância Euclidiana. (45).

### 358 **RESULTADOS**

359

360

### Determinação do número de reduções decimais causadas pelo processo de secagem por spray drying nas 12 cepas de Bacillus cereus

A contagem final de esporos de *B. cereus* no leite integral em pó variou entre 2,4 log<sub>10</sub> e 6,3 log<sub>10</sub> esporos/g massa seca (Tabela 3). Em relação a cepa padrão ATTCC14579, as contagens da população de esporos das cepas 432, 511, 512, 540 não diferiram (p < 0,05), os valores variaram entre 2,4 a 3,8 log<sub>10</sub> esporos/ g massa seca. Entretanto, as cepas 436, B3, B18, B51, B63, B86, B94 apresentam contagens significativamente (p > 0,05) maiores que a cepa padrão, a população de esporos para essas cepas variou entre 4,7 a 6,3 log<sub>10</sub> esporos/ g massa seca.

368 Pode-se observar que houve uma variação na população de esporos sobreviventes 369 após a secagem por spray drying entre as cepas de mesma origem. Para as cepas isoladas de 370 chocolate, observou-se uma variação na contagem após a secagem, de 3,6 log<sub>10</sub> esporos/ g 371 massa seca (Cepa 432) a 6,3 log<sub>10</sub> esporos/ g massa seca (436). Já as cepas isoladas de produtos 372 lácteos apresentaram contagem que variaram entre 2,4 a 3,8 log10 esporos/ g massa seca. A cepa 373 B51 apresentou a segunda maior contagem para a população de esporos após secagem com 6,2 374  $\log_{10}$  esporos/ g massa seca. As cepas isoladas do leite também apresentaram uma contagem 375 entre 5,9 (B94) e 5,6 (B3) log<sub>10</sub> esporos/ g massa seca. Por fim, as contagens das cepas isoladas 376 de amido (B18) e fubá (B86) não diferiram (p < 0.05) a população de esporos foi 5,2 log<sub>10</sub> 377 esporos/ g massa seca. A população de esporos pós- secagem de cepa B63 (refeição pronta) foi 378 de 4,7  $\log_{10}$  esporos/ g massa seca.

379

Tabela 3. Origem das cepas de Bacillus cereus e contagem de esporos após o 380 processo de secagem por spray drying. Antes do processo de secagem, foi inoculado em leite 381 integral 7,2  $\pm$  0,2 log<sub>10</sub> esporos/ g massa seca

Сера	Log10 NF(esporos/ g massa seca)	Origem
ATCC 14579	$3,3 \pm 0,1$	Cepa padrão
432	$3,6 \pm 0,2$	Chocolate
436	$6,3 \pm 0,1$	Chocolate
511	3,8 ± 0,1	Produtos Lácteos
512	$3,7 \pm 0,2$	Produtos Lácteos
540	$2,4 \pm 0,2$	Produtos Lácteos
B3	$5,6 \pm 0,2$	Leite
B18	$5,2 \pm 0,1$	Amido
B51	$6,2 \pm 0,1$	Carne
B63	$4,7 \pm 0,1$	Refeição pronta
B86	$5,2 \pm 0,1$	Fubá
B94	$5,9 \pm 0,1$	Leite

382

383 Na Figura 1 são apresentados o número de reduções decimais ( $\gamma$ ) causadas pelo 384 processo de secagem em spray dryer nos esporos das 12 cepas de B. cereus estudadas. Os 385 valores de  $\gamma$  para o processo de secagem por sprav drying variaram entre 1.1 a 4.7 (cepas 436 e 386 540, respectivamente). As cepas mais resistentes foram as cepas 436, B3, B51 e B94, o número 387 reduções decimais que variou entre 1,1 e 1,5 no processo de secagem por spray drying. As 388 cepas B63, B63 e B86 tiveram γ entre 1,9 e 2,4. Já a cepa utilizada como padrão para processos 389 térmicos (ATCC 14579) teve  $\gamma = 3.9$  e não diferiu (p < 0.05) dos valores de  $\gamma$  causados nas 390 populações de esporos de *B. cereus* das cepas 432, 511, 512 ( $\gamma = 3,5$  a 3,7). O menor valor  $\gamma$  foi 391 observado para a cepa 540 com 4,7 reduções decimais na população de esporos de B. cereus 392 após a secagem por spray drying.

393 A Figura 2 apresenta o agrupamento das cepas com base na sobrevivência ( $\gamma$ ) ao 394 processo de secagem por spray drying. O primeiro grupo é grupo sensível ao processo de spray 395 drying, o  $\gamma$  variou entre 3,3 e 4,7. O grupo sensível tem cepas de diferentes origens: produtos 396 lácteos (511, 512 e 540), chocolate (432) e a cepa padrão ATCC 14579. No segundo grupo, 397 pode-se observar uma subdivisão em dois subgrupos: intermediário com γ variando entre 1,9 e 398 2,4 e compostos pelas cepas B18, B63 e B86. O subgrupo resistente é composto pelas cepas 399 436, B3, B51 e B94, o número de reduções para esse grupo variou entre 1,1 e 1,5. No subgrupo 400 intermediário as cepas foram isoladas de amido (B18), refeição pronta (B63) e fubá (B86). Já 401 para o subgrupo resistente as cepas são de origem: leite (B3 e B94), carne (B51) e chocolate 402 (436). Na análise de agrupamento, observou-se uma variação entre classes de 90,7% e uma 403 variação intraclasse de 9,29%.

404 Pode-se observar que há uma variabilidade na resistência das cepas em relação à
405 origem delas. A heterogeneidade no comportamento dos esporos de 12 cepas de *B. cereus* em
406 relação à sobrevivência ao processo de secagem por atomização pode ser explicada por um
407 elevado coeficiente de variação de 46,1%.



408

409 Figura 1. Número de reduções decimais (γ) causados pelo processo de secagem do leite integral
410 por *spray drying* aos esporos de 12 diferentes cepas de *Bacillus cereus*.

- 411
- 412
- 413
- 414
- . . . .
- 415



417 Figura 2. Análise de agrupamento pelo algoritmo de Ward (46) baseado na distância euclidiana418 entre dois pontos.

419

416

420

### Abordagem estocástica para a inativação microbiana

421 Na Figura 3 está apresentada a distribuição PERT para o tempo de residência a
422 partir dos dados obtidos na literatura, o valor médio estimado pela distribuição foi de 13,2 s.
423 Essa distribuição indica que 90% das partículas apresentam um tempo de residência que varia
424 entre 1,9 a 30,2 s. Apenas 4% das partículas apresentaram tempos de residência inferiores a
425 1,9 s e 1% das partículas apresentaram tempo maiores que 30s.



426

427 Figura 3. Distribuição de probabilidade do tempo de residência da partícula de leite em pó na 428 câmara de secagem a 190 °C ( $\pm$  2 °C) e temperatura de saída de 110 °C ( $\pm$  5 °C), com vazão de 429 alimentação constante (7 × 10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>/h) e pressão de atomização de 0,25 MPa.

430

431Na Figura 4 estão apresentadas as densidades de probabilidade para o número de432reduções decimais para as cepas 436, B63 e 540, cepas consideradas resistentes, intermediárias433e sensíveis, respectivamente. Essas distribuições mostram que a que há uma variação entre os434valores  $D_{110^{\circ}C}$  dessas cepas. Os limiares do valor  $D_{110^{\circ}C}$  estimado para a cepa 540 (sensível)435foram de 0,4 a 6,4 s. Para a cepa B63 (intermediária) foi entre 0,8 a 12,9 s; e para a cepa 436436(resistente) 1,8 a 28,3 s. O valor  $D_{110^{\circ}C}$  da cepa sensível é aproximadamente 2 e 4 vezes menor437que os valores  $D_{110^{\circ}C}$  estimados paras as cepas intermediária e resistente, respectivamente.

438Na Tabela 4 estão os valores D a 110 °C encontrados para as cepas de *B. cereus*439submetidas ao processo de secagem por spray drying. O menor valor D foi de 2,8 s para a cepa440540, enquanto a cepa 436 apresentou um valor D de 12,5 s. Os valores  $D_{110^{\circ}C}$  para as cepas441isoladas de chocolate diferiram (p > 0,05), para a cepa 432 o  $D_{110^{\circ}C}$  foi 3,6 s, enquanto, para a442cepa 436 o  $D_{110^{\circ}C}$  foi 12,5 s. Para as cepas isoladas de produtos lácteos o  $D_{110^{\circ}C}$  variou entre 2,8

443 e 3,9 s. Entretanto, para as cepas isoladas de leite, B3 e B94, os  $D_{110^{\circ}C}$  de 8,9 e 10,6 s, 444 respectivamente. Para a cepa padrão ATCC 14579 o valor  $D_{110^{\circ}C}$  (3,3 s) diferiu (p <0,05) do 445  $D_{110^{\circ}C}$  das cepas isoladas de leite (B3, B94), amido (B18), carne (B51), fubá (B86) e refeição 446 pronta (B63).

447 Entre as cepas consideradas sensíveis ao processo de secagem por spray drying, 448 houve uma variação no valor de 2,8 s (cepa 540) e 3,9 s (cepa 511). Os valores encontrados 449 para essas cepas são quatro vezes menores que aqueles encontrados para as cepas consideradas 450 intermediárias e resistentes. Em relação às cepas intermediárias, observaram-se valores entre 451 5,6 s (cepa B63) e 6,9 s (cepa B18), enquanto que para as cepas consideradas resistentes os 452 valores D variaram de 9,3 s (cepa B51) a 12,5 s (cepa 436). Os valores D<sub>110°C</sub> estimados 453 apresentam diferença significativa (p<0.05) entre os três grupos (resistentes, sensíveis e 454 intermediárias) de cepas avaliados.



455 Figura 4. Função de densidade de probabilidade do número de reduções decimais causada pelo
456 processo de *spray drying* a 110 °C para um representante de cada grupo (resistente,
457 intermediário e sensível) de esporos de *Bacillus cereus*. (A) cepa 436; (B) cepa B63; (C) cepa
458 540.

Cono	Valor D <sub>110°C</sub> (s) <sup>1</sup>	Intervalor de Confiança <sup>2</sup>	
Cepa		5%	95%
432	3,6	0,5	8,4
436	12, 5	1,8	29,2
511	3,9	0,6	9,0
512	3,6	0,5	8,3
540	2,8	0,4	6,5
B18	8,9	1,3	21,0
B3	6,9	0,9	16,2
B51	9,3	1,3	21,9
B63	5,6	0,8	13,0
<b>B86</b>	6,7	0,9	15,5
<b>B94</b>	10,6	1,5	24,9
ATCC 14579	3,3	0,5	7,8

459 Tabela 4. Valores D a 110 °C estimados por distribuições de probabilidade para as cepas de
460 *Bacillus cereus*.

461 <sup>1</sup> valores médios estimados pela função exponencial de melhor ajuste considerando  $\gamma$  (número 462 de reduções) e a distribuição PERT para o tempo de residência da partícula na câmara de 463 secagem do *spray dryer*.

464 <sup>2</sup> limiares do intervalo (95%) da distribuição dos valores  $D_{110^{\circ}C}$  estimados pela função 465 exponencial de melhor ajuste considerando  $\gamma$  (número de reduções) e a distribuição PERT para 466 o tempo de residência da partícula na câmara de secagem do *spray dryer*.

467

468

#### Proteômica de esporos de Bacillus cereus

469 Pode-se observar que a maior parte das proteínas expressas pelas cepas B63 e 540 470 estão localizadas em posições cujos valores de pH são menores que o pH neutro e massa 471 molecular menores que 14,4 kDa (Figura 5). Para a cepa 540, a maior parte das proteínas estão 472 concentradas entre 25 a 116 kDa. O mesmo padrão pode ser observado para a cepa B63. 473 Entretanto, o gel da cepa B63 apresenta uma menor densidade de proteínas expressas do que o 474 da cepa 540, indicando uma diferença fisiológica entre as populações de esporos que foram 475 submetidos ao processo de spray drying. Futuras análises identificarão cada uma das proteínas 476 e o gel de proteômica da cepa 436 será realizado. Os resultados dessas análises permitirão uma
477 comparação mais precisa sobre as diferenças fisiológicas entre os esporos das 3 cepas de *B*.
478 *cereus*. Será possível elucidar a diferença na resistência ao processo de secagem por *spray*479 *drying*.





Figura 5. Gel 2D de proteômica (A) 540; (B) B63

#### 482 **DISCUSSÃO**

483 Os resultados apresentados neste estudo indicam que a origem da cepa não está 484 relacionada com a sua sobrevivência em processos de secagem por spray drying. As 12 cepas 485 de B. cereus caracterizadas apresentaram uma grande variabilidade em relação à sobrevivência 486 ao processo de secagem por atomização. Ao analisar os apresentados neste estudo observou-se 487 que cepas isoladas de uma mesma origem tem valores diferentes para  $D_{110^{\circ}C}$  e  $\gamma$ . As cepas de 488 uma mesma origem, chocolate, tiveram uma variação de 3 vezes no  $\gamma$  (p > 0,05). Entretanto, as 489 cepas isoladas de produtos lácteos não apresentaram variação (p > 0,05) no  $\gamma$  causado pela 490 secagem. A cepa utilizada como referência para processos térmicos (ATCC 14759) apresentou 491 maior sensibilidade ao processo de secagem. Ao considerar-se os parâmetros estimados para 492 sobrevivência da cepa padrão, como referência para o processo de secagem, haverá a 493 subestimativa da sobrevivência de esporos de B. cereus que apresentam maior sobrevivência 494 ao spray drying. A sobrevivência dos esporos de Bacillus sp. pode variar de espécie para 495 espécie, mas também há variabilidade entre cepas de uma mesma espécie, sendo que ainda são 496 poucos os trabalhos que esclarecem esse fenômeno (47, 48). Portanto, a variabilidade na 497 sobrevivência não deve ser desprezada principalmente, quando se trata de uma avaliação 498 quantitativa de risco, pois o impacto na estimativa de risco associada ao consumo pode ser 499 subestimado. A sobrevivência dos esporos após a secagem por atomização pode acarretar em 500 germinação do micro-organismo e consequente deterioração e veiculação de doenças, em 501 produtos formulados a partir de leite em pó contaminado por B. cereus (47, 48). A cadeia 502 produtiva de produtos lácteos é composta por uma sucessão de etapas que impactam na 503 sobrevivência dos micro-organismos. Neste estudo, quantificou-se efeito da operação unitária 504 de secagem por atomização na sobrevivência de esporos de *B. cereus*. Observou-se que esporos 505 de B. cereus das cepas utilizadas neste trabalho são impactados de forma diferente pela secagem 506 por atomização. Dessa forma, a caracterização da variabilidade no comportamento microbiano 507 e a determinação da magnitude do impacto das operações unitárias podem aprimorar e tornar 508 as predições mais realísticas (55).

509Nesse contexto, ao estabelecer critérios de performance, a variabilidade dever ser510observada em cada etapa do processo, visto que, as diversas etapas da cadeia de produção511impactam de formas distintas a sobrevivência dos esporos, e consequentemente nos limites

512 estabelecidos no FSO (*Food Safety Objective*) (56, 57).

513 Este estudo estimou valores  $D_{110^{\circ}C}$  para esporos de 12 cepas de *B. cereus* a partir 514 valores  $\gamma$  obtidos experimentalmente e da distribuição do tempo médio de residência da 515 partícula na câmara de secagem descritos na literatura. Os dados foram inseridos em um modelo 516 de inativação linear e os melhores ajustes foram definidos por simulação usando o algoritmo de 517 Monte Carlo (49). O processo de secagem é uma operação unitária que envolve dois 518 mecanismos, o aumento da temperatura e a redução da atividade de água. No entanto, os esporos 519 são poucos afetados pela redução na atividade de água do meio devido à sua estrutura. Portanto, 520 a temperatura é o principal fator envolvido na inativação de esporos (50, 51)

Nesse contexto, ao estabelecer critérios de performance, a variabilidade dever ser
observada em cada etapa do processo, visto que, as diversas etapas da cadeia de produção
impactam de formas distintas a sobrevivência dos esporos, e consequentemente nos limites
estabelecidos no FSO (*Food Safety Objective*) (52, 53)

Este estudo estimou valores  $D_{110^{\circ}C}$  para esporos de 12 cepas de *B. cereus* considerando as distribuições de  $\gamma$  obtidos experimentalmente e da distribuição do tempo médio de residência da partícula na câmara de secagem descritos na literatura. Os dados foram inseridos em um modelo de inativação linear e os melhores ajustes foram definidos por simulação usando o algoritmo de Monte Carlo (54)

530 Os valores D<sub>110°C</sub> estimados são os primeiros relatos descritos na literatura para descrever a sobrevivência de esporos de B. cereus em processos de spray drying para produção 531 532 de leite em pó. A sobrevivência dos esporos de *B. cereus* em processos de secagem por spray 533 drying é afetada pela combinação de redução na atividade de água e pela temperatura do ar 534 secagem. (55). A temperatura de entrada no processo de secagem reflete as propriedades de 535 evaporação da água, que ocorre rapidamente e a uma taxa constante (20, 56, 57). Nessa etapa, 536 o choque térmico promove a perda de água na gotícula aspergida, sendo que esse fenômeno 537 limita a inativação microbiana (24, 41). A partir da formação da partícula, ocorre a difusão do 538 calor para a parte interna da mesma, onde o processo é mais lento, visto que a temperatura no 539 centro da partícula tende a se aproximar da temperatura de saída do processo. Nesta etapa, há o 540 efeito do calor na inativação microbiana, que é comumente expressado com uma cinética de 541 primeira ordem. Considera-se que a taxa de inativação tem uma relação linear com a 542 temperatura e, portanto, um aumento na temperatura de saída indica maiores efeitos na 543 inativação dos micro-organismos (53,54). A temperatura de ar de saída é a temperatura na qual 544 a partícula deixa a câmara de secagem, diversos estudos relatam que é o principal parâmetro

que afeta a sobrevivência de micro-organismos em processo de secagem por *spray drying* (60–
63).

547 Algumas respostas fisiológicas podem ajudar a explicar a variabilidade na 548 sobrevivência de esporos em populações ao processo de secagem por atomização. Dentre elas, 549 está a formação das proteínas presentes na capa que reveste os esporos que está associada a 550 variabilidade na resistência à processos físicos (47, 64, 65). Futuras análises de proteômica 551 elucidarão as diferenças observadas na sobrevivência dos esporos de B. cereus ao processo de 552 secagem por spray drying. Os resultados apresentados podem contribuir para melhorias nos 553 processos produtivos de alimentos secos por spray drying ajudando na compreensão do 554 comportamento dos esporos de B. cereus perante esse processo de secagem.

#### 555 CONCLUSÕES

Neste estudo, observou-se uma variação no  $\gamma$  de 1,1 a 4,7 para os esporos das 12 cepas de *B. cereus* estudadas. Para as cepas de origem láctea, o y variou entre 1,3 a 4,7 e para as cepas isoladas de chocolate a variação no  $\gamma$  foi 1,1 a 3,7. A cepa ATCC 14579 usada como referência para processos térmicos foi sensível a secagem por spray drying ( $\gamma = 3.9$ ). Foram identificados três grupos distintos, sensível, intermediário e resistente. A variabilidade microbiológica, dependendo do tipo de processamento, é um dos fatores mais relevantes para qualidade microbiológica do produto, pois afeta o nível final de contaminação do alimento. Os resultados apresentados sugerem que a garantia da segurança do alimento está atrelada à avaliação e quantificação da influência de cada etapa do processo nas taxas de sobrevivência de esporos de B. cereus. No contexto de FSO (Food Safety Objective) conhecer e quantificar o efeito das etapas do seu processo pode permitir controlar e garantir a qualidade; segurança dos produtos fabricados e assim proteger a saúde pública. 

### 577 **REFERÊNCIAS**

Spanu C. 2016. Sporeforming bacterial pathogens in ready-to-eat dairy products. Food
 Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods. Elsevier Inc.

580 2. Okinaka RT, Keim P. 2016. The Phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Microbiol*581 Spectr 1–12.

582 3. Carlin F. 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol* 28:177–
583 182.

Kumari S, Sarkar PK. 2014. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group
 from various marketed dairy products in India. *Dairy Sci Technol* 94:483–497.

586 5. Magnusson M, Christiansson A, Svensson B. 2007. *Bacillus cereus* Spores During
587 Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk\r10.3168/jds.2006-754.
588 *J Dairy Sci* 90:2745–2754.

589 6. Peña WEL, de Andrade NJ, Soares NFF, Alvarenga VO, Rodrigues Junior S, Granato
590 D, Giraldo Zuniga AD, de Souza Sant'Ana A. 2014. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on
591 stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *Int Dairy* J 34.

592 7. Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B. 1999. *Bacillus cereus* Spores in Raw Milk :
593 Factors Affecting the Contamination of Milk. *J Dairy Sci* 82:305–314.

8. Banykó J, Vyletelová M. 2009. Determining the source of *Bacillus cereus* and Bacillus
licheniformis isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett Appl Microbiol*48:318–323.

597 9. Yobouet BA, Kouamé-sina SM, Dadié A, Makita K, Grace D, Djé KM, Bonfoh B. 2013.
598 Contamination of raw milk with *Bacillus cereus* from farm to retail in Abidjan, Côte d ' Ivoire
599 and possible health implications. *Dairy Sci Technol* 94:51–60.

600 10. Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M. 2010.
601 Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol*602 27:347–355.

603 11. Owusu-Kwarteng J, Wuni A, Akabanda F, Tano-Debrah K, Jespersen L. 2017.
604 Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato
605 isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiol* 17:65.

- Sadiq FA, Li Y, Liu TJ, Flint S, Zhang G, Yuan L, Pei Z, He GQ. 2016. The heat
  resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria
  isolated from Chinese milk powders. *Int J Food Microbiol* 238:193–201.
- Becker H, Schaller G, von Wiese W, Terplan G. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods
  and dried milk products. *Int J Food Microbiol* 23:1–15.
- 611 14. Reyes JE, Bastías JM, Gutiérrez MR, Rodríguez M de la O. 2007. Prevalence of *Bacillus*612 *cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiol* 24:1–
  613 6.
- 614 15. Larsen HD, Jørgensen K. 1997. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized
  615 milk. *Int J Food Microbiol* 34:179–186.
- 616 16. Lin Y, Ren F, Zhao L, Guo H. 2017. Genotypes and the persistence survival phenotypes
  617 of *Bacillus cereus* isolated from UHT milk processing lines. *Food Control* 82:48–56.
- 618 17. Bhandari BR, Patel KC, Chen XD. 2008. Spray drying of food materials process and
  619 product characteristics, p. 113–159. In Chen, XD, Mujumdar, AS (eds.), *Drying Technologies*620 *in Food Processing*, 1st ed. Blackwell Publishung.
- 18. Schmitz-Schug I, Foerst P, Kulozik U. 2013. Impact of the spray drying conditions and
  residence time distribution on lysine loss in spray dried infant formula. *Dairy Sci Technol*93:443–462.
- 624 19. Usui H, Sano Y, Yanagimoto Y, Kato K. 1985. Residence-Time Distribution of Air
  625 Flow in Spray-Drying Chamber. *J Chem Eng Japan* 18:464–465.
- 20. Zbicinski I, Strumillo C, Delag A. 2002. Drying Kinetics and Particle Residence Time
  in Spray Drying. *Dry Technol* 20:1751–1768.
- 428 21. Jeantet R, Ducept F, Dolivet A, Méjean S, Schuck P. 2008. Residence time distribution:
  a tool to improve spray-drying control. *Dairy Sci Technol* (EDP Sci 88:31–43.
- 630 22. Kieviet F, Kerkhof PJAM. 1995. Measurement of particle residence time distribution in
  631 a co-current spray dryer. *Dry Technol* 5:1241–1248.
- 632 23. Schmitz-Schug I, Kulozik U, Foerst P. 2016. Modeling spray drying of dairy products 633 Impact of drying kinetics, reaction kinetics and spray drying conditions on lysine loss. *Chem*634 *Eng Sci* 141:315–329.

- 635 24. Silva J, Freixo R, Gibbs P, Teixeira P. 2011. Spray-drying for the production of dried
  636 cultures 64:321–335.
- 637 25. in't Veld P, Soentoro P, Notermans S. 1993. Properties of spores in reference materials
  638 prepared from artificially contaminated spray dried milk. *Int J Food Microbiol* 20:23–36.
- 639 26. Beuchat LR, Komitopoulou E, Beckers H, Bett RP, Bourdichon F, Fanning S, Joosten
- 640 HM, Ter Kuile BH. 2013. Low-Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of
- 641 Foodborne Pathogens. *J Food Prot* 76:150–172.
- 642 27. Cal K, Sollohub K. 2010. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters.
  643 *J Pharm* Sci 99:575–586.
- 644 28. Griffiths MW, Schraft H. 2017. Bacillus cereus Food Poisoning, p. 395–405. In Dodd,
- 645 CER, Aldsworth, T, Stein, RA, Cliver, DO, Riemann, HP (eds.), *Foodborne Diseases*. Third
  646 Edit. Elsevier Inc., London.
- Gauvry E, Mathot A, Legu I, Couvert O. 2017. Knowledge of the physiology of sporeforming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res Microbiol*168:369–378.
- 30. Trunet C, Carlin F, Coroller L. 2017. Investigating germination and outgrowth of
  bacterial spores at several scales. *Trends Food Sci Technol* 64:60–68.
- 652 31. Kakagianni M, Aguirre JS, Lianou A, Koutsoumanis KP. 2017. Effect of storage
  653 temperature on the lag time of *Geobacillus stearothermophilus* individual spores. *Food*654 *Microbiol* 67:76–84.
- 655 32. Lianou A, Koutsoumanis KP. 2013. Evaluation of the strain variability of *Salmonella*656 enterica acid and heat resistance. *Food Microbiol* 34:259–267.
- den Besten HMW, Aryani DC, Metselaar KI, Zwietering MH. 2017. Microbial
  variability in growth and heat resistance of a pathogen and a spoiler: All variabilities are equal
  but some are more equal than others. *Int J Food Microbiol* 240:24–31.
- 660 34. Pflug IJ. 1999. *Microbiology and Engineering of Sterilization Process*, 10th ed.
  661 University of Minnesota, Environmental Sterilization Laboratory, Minneapolis.
- 662 35. Martinez RCR, Alvarenga VO, Thomazini M, Fávaro-Trindade CS, Sant'Ana ADS.
  663 2016. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin

- (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*in refrigerated milk. *LWT Food Sci Technol* 68.
- Becker H, Schaller G, von Wiese W, Terplan G. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods
  and dried milk products. *Int J Food Microbiol* 23:1–15.
- Kumari S, Sarkar PK. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy
  processing environment. *Food Control* 69:20–29.
- 670 38. Bennett RW, Tallent SM, Hait JM. 2015. Bacillus cereus and Bacillus cereus Toxins.
- 671 *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public672 Health Association.
- 673 39. Birchal VS, Passos ML. 2005. Modeling and simulation of milk emulsion drying in
  674 spray dryers. *Brazilian J Chem Eng* 22:293–302.
- 675 40. Vose D. 2008. *Risk analysis: a quantitative guide*. John Wiley, Chichester.
- Fu N, Chen XD. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying
  processes. *Food Res Int* 44:1127–1149.
- 42. Wessel D, Flügge UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute
  solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–143.
- 680 43. Gorg A. 2004. 2-D Electrophoresis. *Principles and Methods*. Handbook 163.
- 681 44. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide
  682 gels. *Nat Protoc* 1:1852–1858.
- 45. Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution
  in R language. *Bioinformatics* 20:289–290.
- 46. Ward JH. 1963. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. J Am Stat
  Assoc 58:236.
- 687 47. den Besten HMW, Berendsen EM, Wells-Bennik MHJ, Straatsma H, Zwietering MH.
- 2017. Two complementary approaches to quantify variability in heat resistance of spores of
  Bacillus subtilis. *International Journal of Food Microbiology*. 240:24-31.
- 690 48. Berendsen EM, Zwietering MH, Kuipers OP, Wells-Bennik MHJ. 2015. Two distinct
  691 groups within the Bacillus subtilis group display significantly different spore heat resistance
  692 properties. *Food Microbiol* 45:18–25.

- 49. Aryani DC, den Besten HMW, Hazeleger WC, Zwietering MH. 2015. Quantifying
  strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 208:19–
  29.
- 50. Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:548–72.
- 51. Setlow P. 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not
  know. *J Bacteriol* 196:1297–1305.
- 701 52. Cole M. 2004. Food safety objectives Concept and current status. *Mitteilungen aus*702 *Leb und Hyg* 95:13–20.
- Augustin J-C, Ellouze M, Guillier L. 2016. Microbial risk assessment: integrating and
  quantifying the impacts of food processing operations on food safety, p. 581–599. In *Quantitative Microbiology in Food Processing*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- 706 54. Corporation P. 2013. Add-In do Microsoft Excel para Simulação e Análise de Riscos707 ®. Ithaca.
- 55. Perdana J, Zubia AA, Kutahya O, Schutyser M, Fox M, Perdana J, Zubia AA, Kutahya
  O, Schutyser M. 2015. Spray Drying of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Guided by Predictive
  Modeling Spray Drying of Lactobacillus plantarum WCFS1 Guided by Predictive Modeling.
  Dairy Technol 33:1789–1797.
- 712 56. Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Valero A. 2016. Impact of dehydration and drying
  713 operations on the microbial ecology of foods, p. 160–175. In Sant'Ana, A de S (ed.),
  714 *Quantitative Microbiology in Food Processing*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- 57. Bhandari BR. 2013. Introduction to food powders, p. 1–25. In Bhandari, B, Bansal, N,
  716 Zhang, M, Schuck, P (eds.), *Handbook of Food Powders*. Woodhead Publishing, Oxford.
- 58. LiCari JJ. 1970. *Salmonella* Survival During Spray Drying and Subsequent Handling of
  Skimmilk Powder. II. Effects of Drying Conditions. *J Dairy* Sci 53:871–876.
- 59. Kim SS, Bhowmik SR. 1990. Survival of Lactic Acid Bacteria during Spray Drying of
  Plain Yogurt. *J Food Sci* 55:1008–1010.

721 60. Teixeira P, Castro H, Kirby R. 1994. Spray drying as a method for preparing
722 concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. J Appl Bacteriol 78:456–462.

Gardiner GE, Sullivan EO, Kelly J, Auty M a E, Collins JK, Ross RP, Stanton C. 2000.
Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L*. *salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Appl Environ Microbiol* 66:2605–2612.

Abadias M, Teixidó N, Usall J, Solsona C, Viñas I. 2005. Survival of the postharvest
biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. *Biocontrol Sci Technol* 15:835–846.

Golowczyc MA, Silva J, Abraham AG, De Antoni GL, Teixeira P. 2010. Preservation
of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Lett Appl Microbiol* 50:7–12.

732 64. Abhyankar W, Pandey R, Ter Beek A, Brul S, de Koning LJ, de Koster CG. 2015.

Reinforcement of *Bacillus subtilis* spores by cross-linking of outer coat proteins during
maturation. *Food Microbiol* 45:54–62.

65. Hornstra LM, Ter Beek A, Smelt JP, Kallemeijn WW, Brul S. 2009. On the origin of
heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus spores*: Input for a "systems" analysis
approach of bacterial spore outgrowth. *Int J Food Microbiol* 134:9–15.

#### 738 MATERIAL SUPLEMENTAR



739

Figura S1 – Equipamento *spray dryer* modelo SD 1.0 (LabMaq, Ribeirão Preto,
Brasil) com capacidade nominal de secagem de 1,0 L/ h, dimensões 1800 mm (altura com
rodízios), 500 mm (largura), 800 mm (comprimento).

### CAPÍTULO 3

# Resistência de esporos de *Bacillus cereus* em tubos capilares e durante secagem por *spray drying*

Artigo formatado conforme normas de submissão da revista: "Journal of Food Engineering"

1	Resistência de esporos de <i>Bacillus cereus</i> em tubos capilares e durante
2	secagem por spray <i>drying</i>
3	
4	Verônica O. Alvarenga <sup>1</sup> , Fernanda B. Campgnollo <sup>1</sup> , Arthur K. P. Rodrigues <sup>1</sup> , Deborah A.
5	Conceição <sup>1</sup> , Vanessa M. da Silva <sup>2</sup> , Miriam D. Hubinger <sup>2</sup> , Anderson S. Sant'Ana <sup>1#</sup>
6	
7	<sup>1</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade
8	Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil.
9	
10	<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
11	Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	#Corresponding author: Prof. A.S.Sant'Ana: and@unicamp.br Rua Monteiro Lobato, 80.
20	Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brazil. Phone: +55(19)
21	3521-2174.
22	
23	

#### **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi determinar a variação na resistência ao calor de esporos três cepas de *B. cereus* em diferentes condições de aquecimento em tubo capilar e por spray dryer. Os valores em tubo capilar para D<sub>90°C</sub> variaram entre 10,72 e 35,63 min, 1,48 a 4,56 min para D<sub>100°C</sub> e 0,19 a 0,67 min para D<sub>110°C</sub>. Os valores z para o tubo capilar variaram de 9,7 a 14,9 °C, enquanto que para a secagem por spray dryer essa variação no coeficiente térmico foi de 9,2 a 211,2 °C para a regressão considerando a temperatura de saída do ar. Os resultados observados nesse trabalho sugerem que os meios utilizados influenciam na inativação microbiana, independente das características específicas de cada cepa. A diferença nos parâmetros de inativação determinados em tubo capilar e em spray dryer indicam que a extrapolação de parâmetros cinéticos de inativação obtidos em diferentes sistemas de aquecimento não é justificada. Palavras-chave: sobrevivência de esporos, alimentos com baixa atividade de água, sistemas de aquecimento, valor D, valor z 

#### 54 **1. INTRODUÇÃO**

55 O leite destaca-se na alimentação humana pelo seu valor nutricional como fonte de 56 proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais (Pereira, 2014). Além do papel relevante 57 na alimentação humana, possui grande importância sob o ponto de vista econômico (Zoccal, 58 2016). Todavia, o leite é altamente perecível devido a uma complexa microbiota presente 59 (Quigley et al., 2013), capaz de produzir enzimas (Machado et al., 2017; Neubeck et al., 2015) 60 e outras alterações que podem ter implicações diversas ao longo de seu beneficiamento. Além 61 disso, os leites cru ou pasteurizado têm sido reportados como importantes agentes veiculadores 62 de micro-organismos patogênicos e também têm sido associados a surtos em diferentes países 63 do mundo (Dhanashekar et al., 2012; Langer et al., 2012; Newkirk and Hedberg, 2011; Oliver 64 et al., 2005).

65 Com o objetivo de reduzir perdas associadas à contaminação microbiológica e para 66 facilitar a comercialização, disponibilidade em diferentes partes do mundo e permitir diversas 67 aplicações, a indústria lança mão do processo de secagem do leite. Por suas características e 68 estabilidade, o leite em pó pode ser consumido diretamente ou ser usado em formulações para 69 produção de outros alimentos, como sobremesas lácteas, produtos de cereais, chocolates e 70 fórmulas infantis. Apesar de suas características não permitirem a multiplicação microbiana, se 71 presentes, micro-organismos deteriorantes e patogênicos podem sobreviver por longos períodos 72 no produto (Beuchat et al., 2013; Miller et al., 2015; Spanu, 2016). Desta forma, quando 73 reidratados estes micro-organismos podem encontrar condições adequadas para multiplicação, 74 culminando com sua deterioração ou em surtos de doenças. Além disso, do ponto de vista 75 industrial, a presença de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em leite em pó pode se 76 constituir em um enorme problema, pois sabe-se que os processos térmicos são desenhados 77 considerando-se uma concentração inicial do micro-organismo-alvo. Quaisquer concentrações 78 deste micro-organismo-alvo acima daquela utilizada no desenho dos processos térmicos, pode 79 implicar em sérios problemas de estabilidade e segurança microbiológica para o produto no 80 qual o leite em pó foi utilizado como matéria-prima.

Diversos estudos na literatura reportam a presença de micro-organismos
patogênicos e deteriorantes em leite em pó e produtos formulados à base de leite em pó (Becker
et al., 1994; Beuchat et al., 2013; in't VELD et al., 1993; LiCari, 1970; Reyes et al., 2007;
Zhang et al., 2012). Desta forma, fica evidente que o controle da contaminação microbiana ao
longo da cadeia produtiva deste produto é de vital importância (Lang et al., 2017), tanto para

seu consumo direto, quanto para aplicações industriais. Além da importância da garantia da
qualidade da matéria-prima (Darchuk et al., 2015; Murphy et al., 2016), e da higienização
durante o processamento visando-se evitar a formação de biofilmes (Anand et al., 2014;
Shaheen et al., 2010) e ocorrência de recontaminação (Eneroth et al., 2001, 2000, 1998; Lin et
al., 1998), é extremamente relevante que a indústria seja capaz de quantificar o efeito das etapas
de processamento na concentração de micro-organismos-alvo no produto final.

As bactérias formadoras de esporos são uma grande preocupação para a indústria de lácteos, sendo diversos os estudos que reportam sua incidência desde as matérias-primas até os produtos lácteos (Doll et al., 2017; Larsen and Jørgensen, 1997; Spanu et al., 2016; Watterson et al., 2014). Dentre estes, pode-se destacar *Bacillus cereus*, por sua elevada ocorrência (Banykó and Vyletelová, 2009; Becker et al., 1994; Kumari and Sarkar, 2014; Larsen and Jørgensen, 1997) e associação com surtos de doenças de origem alimentar causadas por produtos lácteos (Bennett et al., 2013; Beuchat et al., 2013; Langer et al., 2012).

A fonte primária de *B. cereus* é o solo, e por vias direta e indireta, os esporos de *B. cereus* podem ser veiculados para o leite cru e disseminados, a partir da matéria-prima, por toda cadeia produtiva (Carlin, 2011; Heyndrickx, 2011). Apesar de micro-organismos esporulados como *B. cereus* não dominarem a microbiota presente no leite cru (Kable et al., 2016; Neubeck et al., 2015), a aplicação de processos térmicos e mecânicos empregados ao longo do processamento podem alterar esta microbiota e levar a uma maior abundância de micro-organismos esporulados no leite em pó (Kumari and Sarkar, 2014).

106 A secagem do leite é feita por diferentes métodos, porém a secagem por spray dryer 107 é provavelmente o mais eficiente e mais econômico dentre os existentes utilizados na indústria 108 de alimentos (Cal and Sollohub, 2010; Sollohub and Cal, 2010). Durante o processo de secagem 109 por spray dryer, elevadas temperaturas são atingidas (200 a 250 °C) para o ar de secagem, sendo 110 que os micro-organismos são expostos a estas condições por um tempo curto (20 - 30 s)111 (Bhandari et al., 2008). Apesar de não ser aplicada com o objetivo de causar redução na 112 contagem de contaminantes microbiana, sabe-se que devido às elevadas temperaturas aplicadas 113 no processo, pode ocorrer inativação de células vegetativas e até de alguns micro-organismos 114 esporulados. Enquanto em processos térmicos de alimentos de alta atividade de água a 115 temperatura constitui-se no principal fator que impacta a inativação microbiana (Smelt and 116 Brul, 2014), durante processos de secagem a difusão do calor pode ser reduzida (Bhandari et 117 al., 2008). Além disso, a mudança no teor de umidade ao longo do processo de secagem das

partículas deve também impactar na inativação microbiana. Soma-se a estes fatores, a
possibilidade de proteção pelo substrato dos danos causados nos esporos pelos choques térmico
e osmótico em processos de secagem por *spray drying* (Arslan et al., 2015; Khem et al., 2015;
Pérez-Chabela et al., 2013).

Ao melhor conhecimento dos autores, inexistem dados a respeito da sobrevivência de esporos de *B. cereus* em diferentes condições de aquecimento e secagem em *spray dryer*. Desta forma, no presente artigo propôs-se avaliar a variação na resistência ao calor de três cepas de *B. cereus* em diferentes condições de aquecimento e de secagem em *spray dryer*. Por fim, comparou-se esses dados de inativação em tubo capilar com os dados obtidos no processo de secagem objetivando-se verificar se os dados obtidos em tubos capilares poderiam ser aplicados na predição da inativação de esporos de *B. cereus* em processos de secagem por *spray drying*.

#### 141 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 142 2.1) Cepas e preparo das suspensões de esporos

143Três cepas de *B. cereus* isoladas de diferentes alimentos [chocolate (cepa 436),144refeição pronta (cepa B63) e produto lácteo (cepa 540] foram utilizadas. Estas três cepas foram145escolhidas por apresentarem diferente comportamento ao processo de secagem por spray drying146em testes preliminares (dados não mostrados). Sendo a cepa 436, a mais resistente, a cepa B63,147com resistência intermediária e a 540 com menor resistência ao processo de secagem por *spray*148*drying*.

149 As suspensões de esporos foram preparadas de acordo com a metodologia proposta 150 por Martinez et al. (2016); Peña et al. (2014); Pflug (1999). As culturas de B. cereus foram 151 inoculadas em caldo nutriente (Kasvi, Curitiba, Brasil) suplementado com sulfato de manganês (10 ppm) (Synth, Diadema, Brasil) e incubadas a 30 °C por 24 h. Em seguida, cada cepa foi 152 153 inoculada em superfície em garrafas de Roux (Uniglass, São Paulo, Brazil) contendo ágar 154 nutriente adicionado de sulfato de manganês (10 ppm) e incubadas a 30 °C por 30 dias, sendo 155 o processo de esporulação acompanhado diariamente por exame microscópico com coloração 156 de verde de malaquita. O procedimento de lavagem dos esporos foi realizado quando a 157 esporulação atingiu 90%. A lavagem da suspensão foi realizada com água destilada estéril 158 seguida de centrifugação (1500 × g por 20 min a 4 °C) (Sorvall Legend XTR Thermofischer, 159 Waltham, EUA). As suspensões de esporos foram ressuspendidas também em água destilada 160 estéril e estocados a -20 °C até o uso.

161

#### 162

2.2)

#### Preparo e inoculação dos meios de aquecimento e secagem

163 Foram testados 3 meios de aquecimento para comparar a resistência dos esporos de 164 B. cereus e para seleção dos meios utilizados nos testes de secagem em spray dryer: leite 165 integral pasteurizado [3,5% (v/v) gordura], tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 e suspensão de 166 talco (10g/L) para os testes em tubos capilares.Para os testes em spray dryer foram utilizados 167 leite integral [3,5% (v/v) gordura], leite desntado [0,0% (v/v) gordura] e suspensão de talco 168 (10g/L). Os lotes de leite integral e desnatado utilizados para os experimentos foram testados 169 com relação à presença de *B. cereus* de acordo com a metodologia descrita por Bennett et al. 170 (2015) e apresentaram contagens  $\leq$  10 esporos/g.

92

171 O tampão fosfato salino (PBS) foi preparado utilizando-se fosfato de sódio 172 monobásico [2,44 g/L] (Dinâmica, Diadema, Brasil), fosfato de sódio dibásico [8,09 g/L] 173 (Dinâmica, Diadema, Brasil) e cloreto de sódio [4,25 g/L] (Dinâmica, Diadema, Brasil), sendo 174 o pH ajustado para 7,2 antes da esterilização a 121 °C por 15 min (Taylor and Pérez, 2015). O 175 Silicato de Magnésio P.A. (Talco) [SiO2.3MgO.H2O] (Dinâmica, Diadema, Brasil) foi 176 ressupendido em água [10 g/L], seguindo-se esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min 177 (Kloepper, 1981). Após o preparo dos meios de aquecimento, um total de 50 mL foram 178 inoculados com cada suspensão separadamente visando-se atingir a concentração final de 7,5 ± 179 0,5 log<sub>10</sub> esporos/mL. A contagem inicial de cada suspensão inoculada nos meios de 180 aquecimento foi confirmada após choque térmico a 80 °C por 30 min, seguindo-se diluições 181 decimais seriadas em água peptona 0,1%, plaqueamento em agar MYP (Manitol Gema de Ovo 182 Polimixina) (Acumedia, Lansing, USA) e incubação a 30 °C por 48 h.

183

#### 184 2.3)Inativação de B.cereus em tubos capilares:

185

2.3.1) Tubos capilares e condições de tempo/temperatura: Os tubos capilares de 186 vidro (ø externo 1,5 mm; ø interno 1,1 mm; comprimento 75 mm [Lamiglass, São Paulo, 187 Brasil]) foram preenchidos com 25 µL de cada meio de aquecimento avaliado, seguindo-se 188 selagem a quente com maçarico. Para a determinação da resistência térmica, os tubos selados 189 foram submersos em banho de óleo com circulação (Cole-Parmer Polystat, modelo 12101-20, 190 Vernon Hills, EUA). As condições de temperatura e tempo avaliados foram 90 °C por 150 min, 191 100 °C por 15 min e 110 °C por 1,5 min, totalizando 27 condições de inativação, testadas em 192 duplicata. Em cada temperatura, foram coletados no mínimo cinco pontos ao longo do tempo 193 de aquecimento. Após aquecimento, os tubos capilares foram imersos em solução de água com 194 detergente para a retirada do óleo, seguido de resfriamento em banho de gelo a 4 °C por 2 195 minutos. Antes da abertura, os capilares foram sanitizados com álcool 70% (v/v).

- 196
- 197

2.3.2) Contagem de B. cereus sobreviventes nos tubos capilares: Após a abertura, 198 seguiu-se transferência do conteúdo de cada tubo capilar para um tubo com 1,8 mL de água 199 peptonada 0,1% (p/v) estéril. Para cada tempo, um total de 10 tubos capilares foram preparados, 200 visando-se atingir um volume de 200 µL para preparo da diluição decimal. As diluições 201 decimais seriadas em água peptonada 0,1% foram preparadas, seguindo-se plaqueamento, 202 inoculação e contagem em placas de ágar MYP (Manitol Gema de Ovo Polimixina) (Acumedia,

Lansing, USA) que foram incubadas a 30 °C por 48 h. Colônias características de *B. cereus*foram enumeradas e os resultados expressos como UFC/g como indicado por Bennett et al.,
205 2015.

206 2.3.3) Análise dos dados de resistência térmica em tubo capilar: Para a análise dos 207 dados de sobrevivência, as contagens foram expressas em esporos por unidade de massa 208 (gramas) em massa seca. Os dados de inativação das três cepas de B. cereus em três diferentes 209 meios de aquecimento em tubo capilar obtidos foram ajustados utilizando-se o modelo log-210 linear apresentado na Equação 1 utilizando-se o suplemento Ginafit (Geeraerd et al., 2005) para Microsoft Excel<sup>®</sup> (Microsoft, Redmond, EUA). A partir desse modelo, foi determinado o tempo 211 212 necessário para que uma redução decimal ocorresse, valor D, nas temperaturas avaliadas. A 213 partir dos valores D obtidos a 90, 100 e 110 °C, para cada cepa e em cada meio de aquecimento, 214 foi determinado o coeficiente térmico. Para o cálculo do coeficiente térmico, valor z, foi ajustada uma regressão linear utilizando-se o Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, EUA). 215

216

$$\log N(t) = \log N_0 - \frac{t}{D} \qquad (1)$$

217 Onde  $N_0$ : contagem inicial de esporos por massa seca de meio de aquecimento 218 (esporos/g massa seca); N: contagem de esporos após o processo de *spray drying* por massa 219 seca de amostra (esporos/g massa seca); t: tempo de aquecimento; D: tempo necessário para 220 uma redução decimal da população de esporos.

221

#### 222 2.4) Inativação durante o processo de secagem em spray dryer

223 2.4.1) Spray dryer e condições de secagem: Os experimentos foram realizados em
224 um spray dryer modelo SD 1.0 (LabMaq, Ribeirão Preto, Brasil).

225

226 2.4.2) Condições de secagem: Foram avaliadas 3 temperaturas de entrada de ar: 190 227  $\pm 2$  °C,  $170 \pm 2$  °C e  $150 \pm 2$  °C, sendo que as temperaturas de saída variaram de acordo com a 228 temperatura de entrada:  $110 \pm 5$  °C,  $105 \pm 5$  °C e  $95 \pm 5$ °C, respectivamente. As temperaturas 229 foram selecionadas considerando as aplicações industriais e a limitação do equipamento. Os 230 demais parâmetros de secagem foram mantidos fixos: vazão do ar de secagem (84 m<sup>3</sup>/h), vazão 231 de alimentação  $(7 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{h})$ , vazão do ar comprimido  $(2,4 \text{ m}^3/\text{h})$  e pressão do ar comprimido (0,25 MPa). Para cada processo de secagem foram utilizados 500 g de cada meio de 232 233 aquecimento inoculado com as suspensões de esporos, separadamente, na concentração de 7,5 234  $\pm$  0,5 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca. No total, foram conduzidos 27 experimentos de secagem 235  $(3 \text{ cepas} \times 3 \text{ meios} \text{ de aquecimento} \times 3 \text{ temperaturas})$ , com duas repetições independentes. 236 Adicionalmente, para cada condição testada, foram preparados controles utilizando-se o meio 237 de aquecimento não inoculado com esporos de B. cereus.

238

239 2.4.2.1) Higienização do spray dryer e medidas de segurança na condução dos 240 experimentos: Após cada processo de secagem, o spray dryer (câmara de secagem, bico 241 aspersor, ciclone, tubulações e mangueiras) foi lavado, higienizado e esterilizado. O 242 procedimento de lavagem consistia na imersão em solução 1.0% (v/v) de detergente alcalino 243 Divostar Quatro<sup>®</sup> (Diversey, São Paulo, Brasil) por 30 min a 30 °C e enxágue com água. Em 244 seguida, era realizada imersão em solução 0,5% (v/v) de detergente ácido Divostar Pascal<sup>®</sup> 245 (Diversey, São Paulo, Brasil) por 20 min a 30 °C sendo enxaguado com água novamente. Para 246 a sanitização, o equipamento foi imerso em solução 0,25% (v/v) de ácido peracético Divostar 247 Forte<sup>®</sup> (Diversey, São Paulo, Brasil) por 20 min, enxaguado com água e esterilizado por 121 °C por 40 min. Outras medidas de segurança adotadas foram: instalação de um filtro tipo HEPA 248 249 com porosidade de 1 micra (LabMaq, Riberão Preto, Brasil) na saída de exaustão de ar do 250 equipamento, antes da descarga do ar no ambiente; e alocação do equipamento em uma sala 251 fechada, a qual era limpa e desinfetada com cloreto de benzalcônio 10% (v/v) antes e após cada 252 processo.

- 253
- 254

2.4.3) Contagem de esporos de B. cereus antes a após o processo de secagem por 255 spray drying: A concentração de esporos de B. cereus no agente carreador foi determinada antes 256 e após cada processo de secagem seguindo-se a metodologia adaptada de Bennett et al. (2015) 257 Antes de cada processo, uma amostra de 10 g de meio inoculado era retirada e submetida a 258 choque térmico a 80 °C por 30 min. Finalizado o processo de secagem, uma amostra contendo 259 1 g de leite em pó era ressuspendida em 9 mL de tampão citrato de sódio (Dinâmica, Diadema, 260 Brasil) para o leite e em 9 mL de água peptonada 0,1% para o talco e submetida a choque 261 térmico a 75 °C por 20 min. As condições utilizadas nos choques térmicos variaram antes e 262 após o processo de secagem. Ensaios preliminares (dados não mostrados), indicaram que para 263 contagem do N<sub>0</sub>, a condição que resultava em melhor recuperação dos sobreviventes era 80 °C 264 por 30 min, em comparação com choques a 70 °C/20 min e 75 °C/ 20 min. Já para a contagem 265 de N<sub>f</sub> (pós-secagem), a condição que resultava em melhor recuperação dos sobreviventes era 266 75 °C por 20 min, em comparação com choques a 70 °C/20 min; 75 °C/ 20 min; 80 °C/30 min; 267 e 90 °C/10 min). Após cada choque, eram preparadas diluições decimais seriadas em tampão 268 citrato (leite) ou água peptonada 0,1% (talco), realizado o plaqueamento em agar MYP e 269 incubação a 30 °C por 48 h. Colônias características de B. cereus foram enumeradas e os 270 resultados expressos como UFC/g como indicado por Bennett et al., 2015.

- 271
- 272

2.4.4) Análise da sobrevivência de esporos de B. cereus em diferentes condições de 273 secagem por spray drying: Para avaliar a sobrevivência de esporos de 3 cepas de B. cereus em 274 3 diferentes meios e 3 condições de secagem por spray drying foi calculado o número de 275 reduções ( $\gamma$ ) em cada condição. O cálculo de  $\gamma$  foi baseado na concentração de esporos por 276 massa seca de amostra, antes e após o processo de secagem, conforme Equação 2.

277

#### $\gamma = log\left(\frac{N_0}{N}\right)$ (2)

278 Onde N<sub>0</sub>: contagem inicial de esporos por massa seca de agente carreador 279 (esporos/g massa seca); N: contagem de esporos após o processo de spray drying por massa 280 seca de amostra (esporos/g massa seca)

281

282 2.4.5) Avaliação do efeito da temperatura do ar de saída na sobrevivência de 283 esporos de B.cereus: Para avaliar o efeito letal da temperatura do ar de secagem de nos esporos 284 de 3 cepas de B. cereus em 3 agente carreadores e diferentes condições de secagem, foi 285 calculado o pseudo – z. Esse parâmetro foi proposto por Kim e Bhowmik (1990) e LiCari (1970) 286 e determina o coeficiente térmico necessário para uma redução logarítmica no  $\gamma$  do processo de 287 secagem. Esse modelo (Equação 3) propõe uma relação linear entre o  $\gamma$  e a temperatura do ar 288 de secagem.

289

$$\log \frac{N}{N_0} = a(T) + b \tag{3}$$

290 Onde N<sub>0</sub>: contagem inicial de esporos por massa seca de agente carreador 291 (esporos/g massa seca); N: contagem de esporos após o processo de spray drying por massa 292 seca de amostra (esporos/g massa seca); a: coeficiente angular e b: coeficiente linear.

293

294 2.5) Determinação da atividade de água e teor de sólidos para determinação de massa seca 295 dos agentes carreadores e dos pós obtidos por secagem por atomização.

Para todos meios, antes e após o processo de secagem, foi determinado a atividade
de água e o teor de sólidos. A atividade de água foi determinada em medidor de atividade de
água (Aqualab, 4TEV, Decagon Devices, Pullman, EUA) a 25 °C. O teor de sólidos das
amostras foi determinado por balança de infravermelho (Gehaka IV3100, São Paulo, Brasil)
(Arslan et al., 2015). As medidas foram realizadas em triplicata.

- 301
- 302 303

### 2.6) Efeito da distribuição do tamanho das partículas na sobrevivência de esporos de B. cereus em processo de secagem por spray drying

304A distribuição do tamanho das partículas foi determinada pelo método de difração305a laser usando-se o medidor de tamanho de partícula Mastersize 2000 (Malvern,306Worcestershire, Reino Unido) equipado com unidade de amostra úmida (Hydro 2000s). Como307meio de dispersão das partículas foi utilizado álcool etílico 99,5% (Dinâmica, Diadema, Brasil).308O diâmetro médio das partículas foi determinado com base no diâmetro da esfera de mesmo309volume, diâmetro de De Brouckere (D<sub>4,3</sub>) apresentado na equação 4. As análises foram310realizadas em triplicata.

311

$$D_{4,3} = \frac{\sum_{i=1}^{n} n.d_i^4}{\sum_{i=1}^{n} n.d_i^3}$$
(4)

312

Onde d<sub>i</sub>: diâmetro das partículas; n: número de partículas.

A partir dos valores do diâmetro da partícula, foi avaliado o efeito dessa medida na sobrevivência dos esporos de 3 cepas de *B. cereus* nos 3 meios (talco, leite integral e leite desnatado) utilizados para o processo de secagem por *spray drying*. Essa relação foi avaliada pela correlação de Pearson.

317

#### 318 2.7) Análises estatísticas

As diferenças no número de reduções decimais ( $\gamma$ ) e aos valores D e z e calculados entre as cepas foram comparadas por ANOVA, pelo teste de Tukey (p = 0,05) e pelo teste t (p = 0,05). Para o valor pseudo – z, as diferenças foram determinadas utilizando-se o teste de Wil Cox (p = 0,05) e para a comparação do diâmetro da partícula na sobrevivência dos esporos foi testada a correlação de Pearson (p = 0,05) utilizando-se o Software R (Versão 3.3.1) (*The R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Áustria).

#### 325 **3. RESULTADOS**

326 3.1) Determinação da resistência térmica em tubo capilar

327 As duplicatas para as curvas de inativação das três cepas de B. cereus (436, 328 B63 e 540) em leite integral, suspensão de talco e tampão fosfato pH 7,2 em tubo capilar 329 não apresentaram ombro e cauda, indicando uma cinética de inativação de primeira ordem 330  $(R^2 > 0.95)$  (Figura 1). As curvas de inativação das cepas 540 e B63 apresentaram 331 tendências de inativação semelhantes em leite integral, enquanto a curva da cepa 436 332 apresentou maior inclinação. Os padrões de inativação dos esporos das cepas 540 e 436 333 a 90 °C foram semelhantes quando os meios de aquecimento foram a suspensão de talco 334 e PBS. (Figuras 1A e 1C, respectivamente).

335 Na Tabela 1 estão descritos os valores D médios e os desvios padrão 336 encontrados para cada cepa de B. cereus nas condições de temperatura e meio de 337 aquecimento estudados. Os valores D<sub>90°C</sub> para a cepa 436 foram 23,03 e 14,39 min em 338 leite e talco, respectivamente. Comparativamente, os valores D<sub>90°C</sub> em leite, para as cepas 339 B63 e 540 foram 24,31 e 20,06 min aproximadamente 1,5 vezes maior. O valor  $D_{100^{\circ}C}$  em 340 suspensão de talco para a cepa 540 foi 4,56 min é aproximadamente 1,6 vezes maior que 341 os valores D<sub>100°C</sub> em suspensão de talco para a cepa B63 (2,81 min) e para a cepa 436 342 (1,75 min). Para a cepa 436 os valores  $D_{100^{\circ}C}$  para suspensão de talco, PBS e leite integral 343 foram 1,75, 1,48 e 1,91 min, respectivamente. Os valores D<sub>100°C</sub> para a cepa B63 em 344 suspensão de talco e leite integral não apresentaram diferença significativa (p > 0.05). 345 Entretanto, os valores D<sub>100°C</sub> para a cepa 540 foram 4,56 min (suspensão de talco) e 3,87 346 (leite integral), diferiram significativamente (p < 0,05). Os valores  $D_{90^{\circ}C}$  e  $D_{110^{\circ}C}$  não 347 diferiram para as cepas B63 e 540, respectivamente (p < 0.05). O aumento da temperatura 348 de inativação em 10 °C reduziu o valor D em aproximadamente 90%, em todos os meios 349 de aquecimento estudados. Observou-se ainda que os valores D para os esporos das 3 350 cepas de B. cereus foram influenciados pela composição do meio de aquecimento. Na 351 Tabela 1 observa-se diferença significativa nos valores D das 3 cepas, quando inativadas em suspensão de talco e em leite integral. A cepa mais resistente foi a cepa 540 que 352 353 apresentou valor  $D_{100^{\circ}C}$  e  $D_{110^{\circ}C}$  duas vezes maior que a cepa mais sensível, 436, quando 354 inativadas em suspensão de talco.



Figura 1. Curva de inativação de esporos de *Bacillus cereus* a 90 °C, (A) Cepa 540 (B)
Cepa B63 (C) Cepa 436. (×) Suspensão de Talco; (●) Leite Integral; (□) Tampão fosfato
pH 7,2 (PBS).

Temperatura	Meio de	Valor D (min)			
(°C) aqueciment		Cepa 540 Cepa B63		Cepa 436	
00	Suspensão de Talco	$10,72 \pm 0,35^{a,B}$	$17,08 \pm 0,90^{c,B}$	$23,03 \pm 0,00^{a,A}$	
90	PBS	$17,71 \pm 0,00^{a,A}$	$35,64 \pm 3,90^{ab,A}$	$23,03 \pm 0,00^{a,A}$	
	Leite integral	$20,06 \pm 1,20^{a,A}$	$24,31 \pm 1,81^{b,A}$	$14,39 \pm 0,00^{b,B}$	
	p valor	0,122	0,007	0,020	
100	Suspensão de Talco	$4,56 \pm 0,06^{a,A}$	$2,81 \pm 0,05^{a,B}$	$1,75 \pm 0,09^{a,C}$	
100	PBS	$4,31 \pm 0,30^{a,A}$	$2,30 \pm 0,10^{b,B}$	$1,48 \pm 0,13^{b,C}$	
	Leite integral	$3,87 \pm 0,05^{b,A}$	$3,09 \pm 0,03^{a,A}$	$1,91 \pm 0,01^{a,B}$	
	p valor	0,022	0,007	0,005	
110	Suspensão de Talco	$0,49 \pm 0,01^{a,A}$	$0,32 \pm 0,01^{a,A}$	$0,20 \pm 0,01^{b, B}$	
110	PBS	$0,62 \pm 0,04^{a,A}$	$0,67 \pm 0,01^{a, A}$	$0,30 \pm 0,02^{a,B}$	
	Leite integral	$0,25 \pm 0,01^{a,A}$	$0,26 \pm 0,01^{a,A}$	$0,19 \pm 0,01^{b,A}$	
-	p valor	0,053	0,083	0,023	

Tabela 1. Valores D para diferentes cepas de *Bacillus cereus* inoculadas em diferentes
meios de aquecimento em tubo capilar.

 $\begin{array}{ll} 360 & \mbox{a-c} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste t (p$ 361 & <0,05) para diferentes meios de aquecimento em uma mesma temperatura para cada cepa. $362 & \mbox{A-C} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa pelo teste$ 363 & Tukey (p < 0,05) para diferentes meios de aquecimento em uma mesma temperatura para364 as 3 cepas estudadas.

365

366 Na Figura 2 estão os valores z encontrados para as três diferentes cepas de *B*.
367 *cereus* nos meios de aquecimento analisados. Os valores z variaram de 9,7 a 10,6 °C para
368 a cepa 436, de 10,5 a 14,9 °C para a cepa 540 e de 10,2 a 11,6 °C para a cepa B63.

Para a cepa 540, os valores de z em leite integral (10, 5°C) e em suspensão de talco (14,9 °C) foram significativamente diferentes (p < 0,05). Entretanto, para essa mesma cepa, 540, os valores z em PBS (13,7 °C) e em suspensão de talco (14,9 °C) não diferiram (p > 0,05). Os valores z em PBS, suspensão de talco não diferiram (p < 0,05) para as cepas B63 e 436. No entanto, os valores de z para leite integral 10,2 °C (cepa B63) e 10,6 °C (cepa 436) são diferentes (p > 0,05) dos valores z observados para essas duas
cepas quando inativadas em suspensão de talco.

Os valores z das 3 cepas de *B. cereus*, não diferiram (p > 0,05) quando o meio
de aquecimento foi PBS e suspensão de talco. Os resultados sugerem que o talco não
apresenta efeito protetivo no esporo de *B. cereus*. Portanto, a partir dos dados apresentado
nesse estudo propôs-se utilizar o talco como veículo para o processo de secagem por *spray drying*.



381

Figura 2. Valores z para esporos de *Bacillus cereus* em diferentes meios de
aquecimento determinados em tubo capilar de vidro. (●) leite integral; (□) PBS, (×)
suspensão de talco.

385

#### 386 387

3.2)

## Análise da sobrevivência de esporos de B. cereus em diferentes condições de secagem por spray drying

388 Considerando a diferença observada no comportamento de inativação dos 389 esporos de 3 cepas de *B. cereus* no leite integral e em suspensão de talco descritos no item 390 3.1, propôs-se estudar a inativação em processo de secagem por spray drying nos 391 seguintes agente carreadores: suspensão de talco, leite integral e leite desnatado. Os testes 392 de secagem em leite integral e leite desnatado objetivaram verificar a influência da 393 gordura na inativação durante o processo de secagem. Sendo assim, o efeito de diferentes 394 condições de secagem (3 temperaturas) foi avaliado para 3 cepas de B. cereus em 3 agente 395 carreadores diferentes, totalizando 27 experimentos. Na Figura 3 está apresentado o 396 número de reduções decimais ( $\gamma$ ) para todas as condições estudadas, sendo que esse 397 número variou entre 0,06 e 4,41 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca. Os valores de  $\gamma$  quando o 398 agente carreador foi suspensão de talco para as cepas 540 e B63 foram 3,1 e 3,3 399 respectivamente, independente da temperatura do ar de secagem. Nas mesmas condições 400 de temperatura e utilizando-se também o talco como veículo de secagem, a cepa 436 401 apresentou  $\gamma$  entre 1,62 e 1,69 log<sub>10</sub>/g de massa seca.

Os processos de secagem usando leite integral e desnatado resultaram nos maiores números de reduções observados, 4,4 e 4,1, respectivamente, para a cepa 540. (Figuras 3B e 3C). Em contrapartida, a redução na temperatura de secagem para 170 e 150 °C, utilizando o leite integral e desnatado, o número de redução causado pela secagem para a cepa 540 foi duas vezes menor, variou entre 2,7 e 2,2. Já para a cepa 436, os comportamentos na secagem de leite integral e de leite desnatado foram semelhantes ao processo de secagem com talco a 190 °C, os valores variaram entre 1,6 e 1,2 reduções.

409 Para a cepa 436, na temperatura de 150 °C, utilizando o leite desnatado como
410 agente carreador, observou o menor número de reduções causado pela secagem 0,1
411 (Figura 3B). Esse valor foi 20 vezes menor que os valores observados para as cepas 540
412 e B63 em leite desnatado, com γ de 2,2 e 2,5, respectivamente.

413

## 414 3.3) Avaliação do efeito da temperatura do ar de saída na sobrevivência de esporos 415 de B. cereus

416 O efeito da temperatura de secagem para as diferentes condições testadas está 417 apresentado na Figura 3. No processo de secagem de leite integral com temperatura de 418 saída do ar de secagem a 110 °C houve a redução de 4,4 ciclos logarítmicos na população 419 de esporos da cepa 540. A redução temperatura de saída ar de secagem em 5 °C, para 105 420 °C, reduziu 60% a sobrevivência da 540 na secagem do leite por *sprav drying*. Para o 421 processo de secagem com a suspensão de talco, a redução logarítmica da população da 422 cepa 540, foi de 3 ciclos, independente da temperatura de saída do ar de secagem de 423 secagem. (Figura 3A).

Para a cepa B63, quando secada em leite integral e desnatado, o aumento na
temperatura de saída do ar de secagem não influenciou o número de reduções decimais
da população de esporos, que foi de 2 ciclos logarítmicos. Para a suspensão de talco, o
aumento na temperatura do ar de entrada e de saída do processo de secagem também não
influenciou o número de reduções, que foi de 3 ciclos logarítmicos. (Figura 3B).

No processo de secagem com suspensão de talco para a cepa 436 o aumento
da temperatura do ar de secagem não influenciou no número de reduções que foi de 1,6.
Entretanto, a variação de temperatura de 15 °C, de 95 °C para 110 °C, incrementou o
número de reduções em 63% para o leite integral e em 440 % para o leite desnatado.
(Figura 3C).

Todas as curvas avaliadas apresentaram um coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) maior que 0,85, com exceção dos processos de secagem para a cepa 540 em leite desnatado e leite integral. Para a cepa B63 as condições de secagem em leite integral e suspensão de talco, os dados também apresentaram baixa correlação com o modelo linear.



Figura 3. Número de reduções decimais considerando-se temperatura de entrada e saída do ar
de secagem. (A) Cepa 540; (B) Cepa B63; (C) Cepa 436. (•) leite desnatado, (Δ) leite integral
e (x) talco.

441Na Tabela 3 estão apresentados os valores pseudo - z para as condições de secagem442avaliadas. Houve diferença significativa (p < 0,05) para os valores pseudo – z observados entre</td>443as condições testadas e também entre as cepas. Considerando-se a temperatura de saúda do ar444do processo de secagem, os valores pseudo – z para os esporos das 3 cepas apresentam diferença445(p < 0,05) quando secas em talco e em leite integral. Entranto, para os processos de secagem</td>446em leite desnatado os valores pseudo-z para as cepas 540 e 436 não diferiram (p > 0,05), já para447a cepa B63 foi significativamente diferente (p < 0,05).</td>

449 Tabela 3. Valores pseudo  $-z^1$  para as condições de temperatura de saída do ar de secagem 450 avaliadas

Agonto corroador	Valor Pseudo - z (°C)			
Agente carreauor	Cepa 540	Cepa B63	Cepa 436	
Talco	67,5 <sup>c</sup>	163,9 <sup>b</sup>	211,2 <sup>a</sup>	
Leite Integral	7,8 <sup>e</sup>	69,6 <sup>c</sup>	38,0 <sup>d</sup>	
Leite Desnatado	9,2 <sup>e</sup>	53,46 <sup>c</sup>	11,21 <sup>e</sup>	
p valor		$7,63 \times 10^{-6}$		

451	<sup>1</sup> Coeficiente térmico (°C) determinado por regressão linear em função do número
452	de reduções ( $\gamma$ ) ocorrido no processo de secagem;
453	<sup>a-e</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ) pelo teste de WilCox.
454	
455	
456	A comparação entre os coeficientes térmicos indicou que os valores z (tubo capilar)
457	e pseudo – z, para a temperatura de saída do ar de secagem foram significativamente diferentes
458	(p < 0,05) para as condições testadas (Figura 1 e Tabela 2). A exceção é a comparação dos
459	valores pseudo – z, considerando-se a temperatura de saída, e z determinados para as cepas 540
460	e 436, condições nas quais os valores foram próximos a 10 °C.

A quantidade de sólidos e a atividade de água dos pós originados a partir de diferentes agentes carreadores estão apresentados na Tabela 4. O teor de sólidos foi influenciado pela temperatura do ar de secagem (p < 0,05) a redução na temperatura diminuiu o teor de sólidos na amostra. O teor de sólidos variou no leite integral entre 92 e 94 g/100 g de sólidos; no leite desnatado entre 92 e 93 g/100 g de sólidos e no talco foi 99 g/100 g de sólidos. A atividade de água variou de 0,43 a 0,45 (leite integral); 0,37 a 0,42 (leite desnatado) e 0,49 a 0,54 (talco).

469 Os maiores valores de atividade de água foram observados para o processo de 470 secagem com a suspensão de talco, 0,543, 0,539 e 0,490 para 150, 170 e 190 °C 471 respectivamente. Nos processos de secagem com o talco, também foram observados os maiores 472 teores de sólidos, acima de 99g/100g de sólidos. A eficiência na remoção de água no processo 473 de secagem está associada diretamente a temperatura de entrada do processo. Na prática, a 474 eficiência na remoção de agua pode ser descrita como a quantidade de calor necessário para a 475 produção de uma unidade de massa seca de produto. Portanto, a quantidade de sólidos presente 476 na amostra é influenciada diretamente pela temperatura de entrada do ar de secagem. (Bhandari 477 et al., 2008).

A ganta agregadarea	Tomporature (0C)	A tividada da água	Teor de sólidos	
Agente carreadores	Temperatura (°C)	Auvidade de agua	(g/100 g de sólidos)	
	150	$0,543 \pm 0,007^{a}$	$99,3 \pm 0,13^{a}$	
Talco	170	$0,539 \pm 0,008^{a}$	$99,5 \pm 0,26^{a}$	
	190	$0,490 \pm 0,005^{\rm b}$	$99,8 \pm 0,13^{a}$	
-	p valor	0,0010	0,1245	
	150	$0,448 \pm 0,025^{\circ}$	$92,7 \pm 0,93^{e}$	
Leite integral	170	$0,444 \pm 0,037^{\circ}$	$94,2 \pm 0,10^{d}$	
	190	$0,429 \pm 0,011^{d}$	$94,6 \pm 0,32^{d}$	
-	p valor	0,0001	3,798 x 10 <sup>-5</sup>	
	150	$0,423 \pm 0,013^{e}$	$92,3 \pm 0,44^{g}$	
Leite desnatado	170	$0,399 \pm 0,030^{\rm e}$	$92,7 \pm 0,15^{g}$	
	190	$0,367 \pm 0,007^{\rm f}$	$93,2 \pm 0,39^{\rm f}$	
	p valor	0,0020	7,88 x 10 <sup>-6</sup>	
	p valor	1,505 x10 <sup>-8</sup>	2,809 x 10 <sup>-13</sup>	

478 Tabela 4. Características dos pós de talco, leite integral e leite desnatado em diferentes 479 condições de secagem por spray drying.

<sup>a-g</sup>Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste t (p < 0.05) 480 481

3.5) 482 Efeito da distribuição do tamanho das partículas na sobrevivência de esporos de B. 483 cereus em processo de secagem por spray drying

484 O tamanho da partícula variou de acordo com o agente carreador, sendo que o 485 diâmetro médio da partícula (D<sub>4,3</sub>) de leite desnatado variou de 6,42 a 7,66 µm; para o leite 486 integral a variação foi de 9,03 a 10,51 µm, enquanto que para o talco foi de 14,74 e 15,74 µm 487 (Tabela 5). O comportamento na distribuição do tamanho de partícula para o leite integral e 488 desnatado foi muito próximo, diferindo da distribuição observada para o talco (Figura 4 e 5).

489 A variação do diâmetro da partícula apresentou um efeito altamente significativo 490 (p < 0,05) sobre o número de redução decimal das populações microbianas das cepas 436 e B63 491 nas diferentes condições de secagem, em todos os meios utilizados para a secagem em spray 492 drying. Esse efeito pode ser explicado também pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) de 493 0,79 para as duas cepas nas condições testadas. No entanto, para a cepa 540 não foi observado 494 esse efeito (Figura 5) nas condições testadas. Observa-se que, para as cepas 436 e 540, a redução
495 no tamanho da partícula promoveu o aumento na sobrevivência dos esporos.



496

497 Figura 4. Distribuição do diâmetro da partícula para talco, leite integral e leite desnatado com
498 temperatura de entrada de 190°C. (•) leite desnatado, (Δ) leite integral e (×) talco.
499



501Figura 5. Correlação entre o diâmetro médio  $(D_{4,3})$  das partículas e o número de reduções nos502esporos de *Bacillus cereus* causados pelo processo de secagem por *spray drying*. ( $\Box$ ) cepa 540

Agente	Temperatura	$D_{[4,3]}(\mu m)^1$	$d_{10}(\mu m)^2$	$d_{50}  (\mu m)^3$	d90 (µm) <sup>4</sup>	Span <sup>5</sup>
carreador	(°C)					
	190	$14,95 \pm 0,49$	$2,14 \pm 0,12$	$12,46 \pm 0,86$	$31,63 \pm 0,04$	$2,37 \pm 0,17$
Talco	170	$14,74 \pm 0,41$	$2,11 \pm 0,10$	$12,10 \pm 0,33$	$31,62 \pm 0,81$	$2,44 \pm 0,01$
	150	$15,34 \pm 0,43$	$2{,}29\pm0{,}04$	$13,13 \pm 0,45$	$31,93 \pm 0,80$	$2,\!26\pm0,\!02$
Loito	190	$10,51 \pm 0,95$	$2,70 \pm 0,18$	$6,17 \pm 0,55$	$14,80 \pm 2,20$	$1,96 \pm 0,16$
integral	170	$10,\!29\pm0,\!78$	$2,55 \pm 0,15$	$5,72 \pm 0,21$	$15,50 \pm 0,73$	$2,\!27\pm0,\!02$
integrai	150	$9,03 \pm 0,29$	$2{,}79\pm0{,}05$	$5{,}71\pm0{,}06$	$11,75 \pm 0,10$	$1,\!57\pm0,\!02$
Loito	190	$7,61 \pm 0,00$	$2,24 \pm 0,04$	$6,49 \pm 0,08$	$14,33 \pm 0,30$	$1,86 \pm 0,08$
Lette	170	$7,66 \pm 0,90$	$1,\!97\pm0,\!18$	$5,92 \pm 0,22$	$12,77 \pm 0,49$	$1,83 \pm 0,01$
uesnatado	150	$6{,}42 \pm 0{,}09$	$2{,}08 \pm 0{,}08$	$4,\!97 \pm 0,\!01$	$11,15 \pm 0,23$	$1,83 \pm 0,07$

Tabela 5. Características das partículas após o processo de secagem por *spray drying*.

506  ${}^{1}D_{[4,3]}$ : diâmetro médio da partícula;  ${}^{2}d_{10}$ : distribuição do diâmetro de até 10% das 507 partículas;  ${}^{3}d_{50}$ : distribuição do diâmetro de até 50% das partículas;  ${}^{4}d_{90}$ : distribuição do 508 diâmetro de até 90% das partículas;  ${}^{5}$ span: tamanho da distribuição dado por (d<sub>90</sub> - d<sub>10</sub>)/(d<sub>50</sub>).
# 510 **4. DISCUSSÃO**

511

U**SSÃO** Na literatura, os valores D a 90 °C para esporos de *B. cereus* em leite e produtos

512 lácteos variam entre 1,1 e 20,7 min (Mazas et al., 1999; Stoeckel et al., 2013; Zhang et al., 513 2012). Os valores D<sub>90°C</sub> observados para os esporos das cepas 540, B63 e 436 são concordantes 514 com os dados encontrados na literatura. A partir dos resultados apresentados neste estudo, 515 sugere-se que a composição do meio de aquecimento deve ser considerada para a caracterização 516 dos padrões de inativação dos esporos de B. cereus. Apesar da atividade de água dos três meios 517 de aquecimento estudados não diferirem (p > 0,05) (suspensão de talco 0,998  $\pm$  0,002, PBS 518 0,992 ± 0,001 e leite integral 0,995 ± 0,002), o comportamento de inativação não foi 519 semelhante. Portanto, a composição do meio com relação à presença de carboidratos, proteínas 520 e gordura tem efeito preponderante na sobrevivência dos micro-organismos (Mazas et al., 1999; 521 Santillana Farakos et al., 2014).

522 As diferentes condições de secagem foram definidas a partir dos resultados obtidos 523 nos estudos de inativação em tubo capilar. Os resultados de sobrevivência de esporos de 3 cepas 524 de B. cereus em processos de secagem por spray drying indicaram diferenças significativas (p 525 < 0.05) entre o número de reduções causado pelas diferentes condições de secagem. Esses 526 resultados sugerem que as cepas apresentam uma propriedade biológica que confere a elas a 527 capacidade de comportamento diferente quando expostas ao processo de secagem. Além disso, 528 a variação do número de reduções decimais entre os agentes carreadores apresentou uma 529 heterogeneidade influenciada pela temperatura do agente carreador (p < 0.05). Com o aumento 530 da temperatura de secagem, houve a redução na sobrevivência dos micro-organismos. A 531 combinação entre a temperatura e a redução da quantidade de água no meio exerce influência 532 na sobrevivência de células vegetativas de micro-organismos, sendo a avalição desse fator 533 importante para entender a inativação de células microbiana (Huang et al., 2017b; Pispan et al., 534 2013). Entretanto, os esporos têm pouca influência da redução da atividade de água do meio, 535 pois a sua estrutura é altamente desidratada e o material genético é protegido por uma estrutura 536 cristalina (Nicholson et al., 2000; Setlow e Setlow, 2014). Portanto, a temperatura é o fator que 537 exerce maior influência no controle da sobrevivência dos esporos (Nicholson et al., 2000).

538 O processo de secagem é uma operação unitária que envolve dois mecanismos, o 539 aumento da temperatura e a redução da atividade de água. Portanto, a inativação microbiana 540 para células vegetativas ocorre pela associação entre o efeito térmico e a redução da quantidade 541 de água presente no meio. O processo de inativação ocorre principalmente no início do processo 542 de secagem, pois nesse ponto inicia-se a difusão de massa com a remoção da umidade por meio 543 de convecção forçada. Nessa etapa, há troca térmica entre o ar de secagem e o material a ser 544 seco. Em uma segunda fase, durante o tempo de residência da partícula na câmara de secagem, 545 sugere-se que há um aumento da temperatura da partícula até a sua saída da câmara de secagem 546 (Chen e Patel, 2007; Huang et al., 2017b; Wang et al., 2016). Desta forma, Kim e Bhowmik 547 (1990) e LiCari (1970) propuseram um parâmetro, o valor pseudo – z para avaliar a influência 548 da temperatura do ar de secagem na sobrevivência de micro-organismos. Esse parâmetro 549 estabelece uma relação linear entre a temperatura e o logaritmo do número de reduções. Essa 550 correlação pode ser feita porque a inativação microbiana pode ser descrita por uma reação 551 cinética de primeira ordem e, além disso, o processo de inativação dos esporos ocorre a uma 552 taxa constante (Pflug, 1999). Apesar da temperatura de saída não refletir a história térmica da 553 partícula, pode ser usada como um indicativo do controle da sobrevivência de micro-554 organismos em processos de secagem (LiCari, 1970; Xueyong et al., 2008). Nesta fase final da 555 secagem, o teor de umidade da gotícula cai abaixo do teor de umidade crítico, a taxa de remoção 556 de umidade reduz gradualmente com o tempo. Portanto, durante este estágio, a temperatura da 557 gota atinge a temperatura do ar de saída, uma vez que a superfície da gota não está mais saturada 558 para manter a temperatura na temperatura correspondente do bulbo úmido (fenômeno limitado 559 por difusão) (Bhandari et al., 2008).

560 Os valores z obtidos em tubo capilar não devem ser extrapolados para processos 561 cujo os mecanismos de inativação são uma combinação entre a ação do calor e a redução da atividade de água. Essa diferença nos valores z também foi observada entre processos de 562 563 aquecimento por fluxo contínuo e aquecimento em tubo capilar (Berendsen et al., 2015). De 564 modo geral, os resultados indicam que a extrapolação de parâmetros cinéticos de inativação 565 obtidos em diferentes sistemas de aquecimento não é justificada, pois a eficiência na 566 transferência do calor ocorre de forma diferente em cada sistema (Berendsen et al., 2015; Chen 567 and Patel, 2007; Schmitz-Schug et al., 2016, 2013). Os resultados apresentados neste trabalho 568 são a primeira descrição de que comparações dos coeficientes térmicos obtidos em tubos 569 capilares não devem ser extrapolados para processos de secagem por spray drying.

570 Com relação as características dos pós dos três materiais testados, suspensão de 571 talco, leite integral e leite desnatado, a distribuição do tamanho das partículas apresentou 572 diferença (p < 0,05) (Figura 4 e Tabela 5). O tamanho e a distribuição das partículas no processo 573 de secagem por *spray drying* são dependentes do tamanho da gota atomizada, das propriedades físicas e da concentração de sólidos do agente carreador. Outro fator que pode influenciar no
tamanho da partícula é o aumento da viscosidade, pois requer mais energia para a atomização
e consequente formação da gota (Koca et al., 2015).

577 A correlação entre sobrevivência e diâmetro da partícula foi observada na 578 inativação de Salmonella em leite (LiCari, 1970). Associa-se que partículas com menor 579 diâmetro apresentem tendência de desaceleração dentro da câmara de secagem, expondo-se a 580 um maior tempo de secagem e consequentemente causando uma maior inativação microbiana 581 (Kim and Bhowmik, 1990; Pispan et al., 2013). Entretanto, trabalhos recentes sugerem que a 582 morfologia da partícula, a estrutura do material e a posição do micro-organismo dentro do 583 material influenciam na inativação microbiana (Fu and Chen, 2011; Huang et al., 2017b; Wang 584 et al., 2016). Essa influência pode estar relacionada à fase de transição do material de secagem 585 para a fase anamorfa ou a formação de película (Huang et al., 2017b). Para as três cepas de B. 586 cereus avaliadas, os menores números de reduções decimais foram observados em leite integral 587 e desnatado, com exceção dos processos a 190 °C para 540 que apresentaram  $\gamma = 4$ . Alguns 588 estudos sugerem que a sobrevivência de micro-organismos está associada à propriedade do 589 material utilizado como meio para o processo de secagem (Alves et al., 2016; Atalar and 590 Dervisoglu, 2015; Huang et al., 2017a, 2017b; Paéz et al., 2012; Perdana et al., 2013; Pop et 591 al., 2015).

592 Outro resultado relevante apresentado nesse estudo foi a diferença na resistência 593 das 3 cepas quando submetidas ao calor úmido e ao calor seco. Nos testes de inativação em 594 tubo capilar a cepa 540 foi a mais resistente e a 436 a menos resistente. No processo de secagem 595 por spray drying a cepa que sofreu menor número de reduções foi a cepa 436, já a cepa 540 596 sofreu o maior número de reduções em todas condições de secagem testada. De acordo com 597 Tiburski et al. (2014) o conteúdo de água no cerne do esporo influencia na resistência à processo 598 com o uso de calor. Os esporos com menor teor de água têm maior resistência aos processos 599 conduzidos com calor seco (Nicholson et al. 2000; Setlow, 2014; Tiburski et al. 2014).

600

# 601 **5. CONCLUSÃO**

602Os resultados observados sugerem que os meios influenciam na inativação603microbiana, tanto na resistência térmica determinada em tubo capilar quanto nos processos de604secagem por *spray drying*. Além da variabilidade na resistência das cepas de *B. cereus*, foi605observado diferença nos parâmetros de inativação determinados em tubo capilar e em *spray*606*dryer*, indicando que a extrapolação de parâmetros cinéticos de inativação obtidos em diferentes607sistemas de aquecimento não é justificada, dado que a eficiência na transferência do calor ocorre608de forma diferente em cada sistema.

A combinação de todos os efeitos do processo de secagem por *spray drying* traz complexidade para a modelagem da cinética de inativação microbiana, portanto, ainda são poucos os trabalhos que descrevem a sobrevivência de micro-organismos patogênicos submetidos ao processo de secagem por *spray dryer* (in't VELD et al., 1993; LiCari, 1970).

613 Os processos de secagem utilizando leite integral causaram nas cepas de *B. cereus* 614  $\gamma$  que variaram entre 0,8 e 4,4, no leite desnatado essa variação foi de 0,1 a 4,1 reduções. 615 Entretanto, no processo de secagem com a suspensão de talco a variação foi menor, o  $\gamma$  variou 616 de 1,7 a 3,3. As variações no número de redução indicam que além da influência da temperatura, 617 a sobrevivência dos micro-organismos sofre interferência do material utilizado na secagem e 618 da característica da cepa submetida à secagem.

619

# 620 6. REFERÊNCIAS

621 Alves, N.N., Messaoud, G. Ben, Desobry, S., Costa, J.M.C., Rodrigues, S., 2016. Effect of 622 drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a 623 non-dairy fermented probiotic juice powder. J. Food Eng. 189, 45-54. 624 doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.05.023

- Anand, S., Singh, D., Avadhanula, M., Marka, S., 2014. Development and Control of Bacterial
- 626 Biofilms on Dairy Processing Membranes *Comp. Rev. in Food Sci. and Food Safety*.13, 18–33.
- 627 doi:10.1111/1541-4337.12048
- 628 Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A., 2015. Microencapsulation of probiotic
- 629 Saccharomyces cerevisiae var. boulardii with different wall materials by spray drying. LWT 630 *Food Sci. Technol.* 63, 685–690. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.034
- Atalar, I., Dervisoglu, M., 2015. Optimization of spray drying process parameters for kefir
  powder using response surface methodology. *LWT Food Sci. Technol.* 60, 751–757.
  doi:10.1016/j.lwt.2014.10.023
- 634 Banykó, J., Vyletelová, M., 2009. Determining the source of Bacillus cereus and Bacillus
- 635 *licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett. Appl. Microbiol.* 48,
- 636 318–323. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02526.x
- 637 Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W., Terplan, G., 1994. Bacillus cereus in infant foods and
- 638 dried milk products. Int. J. Food Microbiol. 23, 1–15. doi:10.1016/0168-1605(94)90218-6
- 639 Bennett, R.W., Tallent, S.M., Hait, J.M., 2015. Bacillus cereus and Bacillus cereus Toxins, in:
- 640 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public
- 641 Health Association. doi:10.2105/MBEF.0222.036
- 642 Bennett, S.D., Walsh, K.A., Gould, L.H., 2013. Foodborne Disease Outbreaks Caused by
- 643 Bacillus cereus, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus United States, 1998
- 644 2008. Clin. Infect. Dis. 57, 425–433. doi:10.1093/cid/cit244
- 645 Beuchat, L.R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Bett, R.P., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten,
- 646 H.M., Ter Kuile, B.H., 2013. Low–Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of
- 647 Foodborne Pathogens. J. Food Prot. 76, 150–172. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-211

- 648 Bhandari, B.R., Patel, K.C., Chen, X.D., 2008. Spray drying of food materials process and
- 649 product characteristics, in: Chen, X.D., Mujumdar, A.S. (Eds.), Drying Technologies in Food
- 650 *Processing*. Blackwell Publishung, pp. 113–159.
- 651 Cal, K., Sollohub, K., 2010. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. J.
- 652 Pharm. Sci. 99, 575–586. doi:10.1002/jps.21886
- Carlin, F., 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol.* 28, 177–182.
  doi:10.1016/j.fm.2010.07.008
- 655 Chen, X.D., Patel, K.C., 2007. Micro-organism inactivation during drying of small droplets or
- 656 thin-layer slabs A critical review of existing kinetics models and an appraisal of the drying
- 657 rate dependent model. J. Food Eng. 82, 1–10. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.12.013
- 658 Darchuk, E.M., Meunier-goddik, L., Waite-cusic, J., 2015. Short communication : Microbial
- quality of raw milk following commercial long-distance hauling. *J. Dairy Sci.* 98, 8572–8576.
  doi:10.3168/jds.2015-9771
- Dhanashekar, R., Akkinepalli, S., Nellutla, A., 2012. Review Milk-borne infections . An
  analysis of their potential effect on the milk industry. *Germs* 2, 101–109.
- 663 Doll, E. V, Scherer, S., Wenning, M., 2017. Spoilage of Microfiltered and Pasteurized Extended
- 664 Shelf Life Milk Is Mainly Induced by Psychrotolerant Spore-Forming Bacteria that often
- 665 Originate from Recontamination. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.00135
- Eneroth, A., Ahrne, S., Molin, G., 2000. Contamination of milk with Gram-negative spoilage
  bacteria during filling of retail containers. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 99–106.
- 668 Eneroth, A., Birgitta, S., Molin, G., Christiansson, A., 2001. Contamination of pasteurized milk 669 J. Bacillus cereus in the filling machine. Dairy Res. 68. 189–196. bv 670 doi:10.1017/S002202990100485X
- 671 Eneroth, A., Christiansson, A., Brendehaug, J., Molin, G., 1998. Critical Contamination Sites
- 672 in the Production Line of Pasteurised Milk, with Reference to the Psychrotrophic Spoilage
- 673 Flora. Int. Dairy J. 6946, 829–834.
- Fu, N., Chen, X.D., 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying
- 675 processes. Food Res. Int. 44, 1127–1149. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.053

- 679 Heyndrickx, M., 2011. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil
- 680 for Contamination of Industrial Food Processing. Appl. Environ. Soil Sci. 2011, 1-11.
- 681 doi:10.1155/2011/561975

684

- Huang, S., Méjean, S., Rabah, H., Dolivet, A., Le Loir, Y., Chen, X.D., Jan, G., Jeantet, R.,
- 683 Schuck, P., 2017a. Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of
- 685 doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.10.017

probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. J. Food Eng. 196, 11-17.

- Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X.D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., Jeantet, R., 2017b.
- 687 Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends Food Sci. Technol.*
- 688 63, 1–17. doi:10.1016/j.tifs.2017.02.007
- 689 in't VELD, P., SOENTORO, P., NOTERMANS, S., 1993. Properties of spores in reference
- materials prepared from artificially contaminated spray dried milk. *Int. J. Food Microbiol.* 20,
  23–36. doi:10.1016/0168-1605(93)90057-N
- 692 Kable, M.E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., Mcleod, J., Heidenreich, J., Marco, L.,
- 693 2016. The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact
- 694 of Transfer to a Milk Processing Facility. *MBio* 7, 1–13. doi:10.1128/mBio.00836-16
- Khem, S., Woo, M.W., Small, D.M., Chen, X.D., May, B.K., 2015. Agent selection and
  protective effects during single droplet drying of bacteria. *Food Chem.* 166, 206–214.
  doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.010
- Kim, S.S., Bhowmik, S.R., 1990. Survival of Lactic Acid Bacteria during Spray Drying of Plain
  Yogurt. J. Food Sci. 55, 1008–1010. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb01585.x
- 700 Kloepper, J.W., 1981. Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation
- 701 of Potato Seed Pieces. *Phytopathology* 71, 590. doi:10.1094/Phyto-71-590
- 702 Koca, N., Erbay, Z., Kaymak-Ertekin, F., 2015. Effects of spray-drying conditions on the
- ros chemical, physical, and sensory properties of cheese powder. J. Dairy Sci. 98, 2934-43.
- 704 doi:10.3168/jds.2014-9111

- 708 Lang, E., ChemlalL, L., Molin, P., Guyot, S., Alvarez-Martin, P., Perrier-Cornet, J.-M.,
- Dantigny, P., Gervais, P., 2017. Modelling the heat inactivation of foodborne pathogens in milk
- 710 powder : high relevance of the substrate water activity. *Food Res. Int.*
- 711 Langer, A.J., Ayers, T., Grass, J., Lynch, M., Angulo, F.J., Mahon, B.E., 2012. Nonpasteurized
- 712 Dairy Products, Disease Outbreaks, and state laws-United States, 1993-2006. Emerg. Infect.
- 713 Dis. 18, 385–391. In Press
- 714 Larsen, H.D., Jørgensen, K., 1997. The occurrence of Bacillus cereus in Danish pasteurized
- 715 milk. Int. J. Food Microbiol. 34, 179–186. doi:10.1016/S0168-1605(96)01182-8
- 716 LiCari, J.J., 1970. Salmonella Survival During Spray Drying and Subsequent Handling of
- 717 Skimmilk Powder. II. Effects of Drying Conditions. J. Dairy Sci. 53, 871–876.
  718 doi:10.3168/jds.S0022-0302(70)86309-3
- 719 Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J.A., Griffiths, M.W., 1998. Identification of contamination
- sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 159–171.
- 721 Machado, S.G., Baglinière, F., Marchand, S., Coillie, E. Van, 2017. The Biodiversity of the
- 722 Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine
- 723 Milk and Dairy Products. *Frontiers in Microb.* 8, 1–22. doi:10.3389/fmicb.2017.00302
- 724 Martinez, R.C.R., Alvarenga, V.O., Thomazini, M., Fávaro-Trindade, C.S., Sant'Ana, A.D.S.,
- 725 2016. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin
- 726 (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*
- 727 in refrigerated milk. LWT Food Sci. Technol. 68. doi:10.1016/j.lwt.2015.12.027
- Mazas, M., Lopez, M., Martinez, S., Bernardo, A., Martin, R., 1999. Heat resistance of Bacillus
- *cereus* spores : effects of milk constituents and stabilizing additives. J. Food Prot. 62, 410–413.
- 730 Miller, R.A., Kent, D.J., Watterson, M.J., Boor, K.J., Martin, N.H., Wiedmann, M., 2015. Spore
- 731 populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. J. Dairy
- 732 Sci. 98, 8492–8504. doi:10.3168/jds.2015-9943

- Murphy, S.C., Martin, N.H., Barbano, D.M., Wiedmann, M., 2016. Influence of raw milk
  quality on processed dairy products : How do raw milk quality test results relate to product
  quality and yield *J. Dairy Sci.* 99, 10128–10149. doi:10.3168/jds.2016-11172
- 736 Neubeck, M. Von, Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L.,
- 737 Hinrichs, J., Scherer, S., Wenning, M., 2015. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota
- 738 and their enzymatic spoilage potential. Int. J. Food Microbiol. 211, 57-65.
- 739 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001
- 740 Newkirk, R., Hedberg, C., 2011. Establishing a Milkborne Disease Outbreak Profile : Potential
- Food Defense Implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 433–437.
- 742 Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of
- 743 Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol. Mol.
- 744 Biol. Rev. 64, 548–72. doi:10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000
- 745 Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A., 2005. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy
- Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 2,
  115–128.
- 748 Paéz, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinheimer, J., 2012.
- 749 Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated
- 750 gastrointestinal digestion. *Food Res. Int.* 48, 748–754. doi:10.1016/j.foodres.2012.06.018
- 751 Peña, W.E.L., de Andrade, N.J., Soares, N.F.F., Alvarenga, V.O., Rodrigues Junior, S.,
- 752 Granato, D., Giraldo Zuniga, A.D., de Souza Sant'Ana, A., 2014. Modelling Bacillus cereus
- adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. Int. Dairy J. 34.
- 754 doi:10.1016/j.idairyj.2013.08.006
- 755 Perdana, J., Bereschenko, L., Fox, M.B., Kuperus, J.H., Kleerebezem, M., Boom, R.M.,
- 756 Schutyser, M.A.I., 2013. Dehydration and thermal inactivation of Lactobacillus plantarum
- 757 WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. Food Res. Int. 54, 1351–
- 758 1359. doi:10.1016/j.foodres.2013.09.043
- 759 Pereira, P.C., 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. Nutrition 30,
- 760 619–627. doi:10.1016/j.nut.2013.10.011

- Pérez-Chabela, M.L., Lara-Labastida, R., Rodriguez-Huezo, E., Totosaus, A., 2013. Effect of
  Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters
- 763 Properties. *Food Bioprocess Technol.* 6, 1505–1515. doi:10.1007/s11947-012-0865-y
- 764 Pflug, I.J., 1999. Microbiology and Engineering of Sterilization Process, 10th ed. University of
- 765 Minnesota, Environmental Sterilization Laboratory, Minneapolis.
- Pispan, S., Hewitt, C.J., Stapley, A.G.F., 2013. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12
- and L. acidophilus undergoing spray drying. *Food Bioprod.* Process. 91, 362–369.
  doi:10.1016/j.fbp.2013.01.005
- 769 Pop, O.L., Brandau, T., Schwinn, J., Vodnar, D.C., Socaciu, C., 2015. The influence of different
- polymers on viability of *Bifidobacterium lactis* 300b during encapsulation, freeze-drying and
- 771 storage. J. Food Sci. Technol. 52, 4146–4155. doi:10.1007/s13197-014-1441-4
- 772 Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter,
- P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol. Rev. 37, 664-698.
- 774 doi:10.1111/1574-6976.12030
- 775 Reyes, J.E., Bastías, J.M., Gutiérrez, M.R., Rodríguez, M. de la O., 2007. Prevalence of Bacillus
- cereus in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. Food Microbiol. 24,
- 777 1-6. doi:10.1016/j.fm.2006.04.004
- 778 Santillana Farakos, S.M., Schaffner, D.W., Frank, J.F., 2014. Predicting Survival of Salmonella
- in Low–Water Activity Foods: An Analysis of Literature Data. J. Food Prot. 77, 1448–1461.
- 780 doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-013
- 781 Setlow, P., 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know.
- 782 J. Bacteriol. 196, 1297–1305. doi:10.1128/JB.01455-13
- 783 Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M.A., Christiansson, A., Salkinoja-Salonen, M., 2010.
- 784 Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol*.
- 785 27, 347–355. doi:10.1016/j.fm.2009.11.004
- 786 Smelt, J.P.P.M., Brul, S., 2014. Thermal inactivation of microorganisms. Crit. Rev. Food Sci.
- 787 Nutr. 54, 1371–1385. doi:10.1080/10408398.2011.637645
- 788 Sollohub, K., Cal, K., 2010. Spray Drying Technique: II. Current Applications in
- 789 Pharmaceutical Technology. J. Pharm. Sci. 99, 587–597. doi:10.1002/jps.21963

- 790 Spanu, C., 2016. Sporeforming bacterial pathogens in ready-to-eat dairy products. In: Food
- 791 Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801916-
- 792 0.00015-7
- 793 Spanu, C., Scarano, C., Spanu, V., Pala, C., Casti, D., Lamon, S., Cossu, F., Ibba, M., Nieddu,
- 794 G., Santis, E.P.L. De, 2016. Occurrence and behavior of Bacillus cereus in naturally
- 795 contaminated ricotta salata cheese during refrigerated storage. *Food Microbiol.* 58, 135–138.
- 796 doi:10.1016/j.fm.2016.05.002
- 797 Stoeckel, M., Westermann, A.C., Atamer, Z., Hinrichs, J., 2013. Thermal inactivation of
- *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Sci. Technol.* 93, 163–
  175. doi:10.1007/s13594-012-0101-6
- 800 Taylor, T.M., Pérez, K.L., 2015. 67. Microbiological Media, Reagents, and Stains, in:
- 801 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public
- 802 Health Association. doi:10.2105/MBEF.0222.072
- Tiburski, J.H., Rosenthal, A., Guyot, S., Perrier-Cornet, J.-M., Gervais, P., 2014. Water
  Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance. *Food Biophys.* 9, 10–19.
  doi:10.1007/s11483-013-9312-5
- 806 Wang, J., Huang, S., Fu, N., Jeantet, R., Chen, X.D., 2016. Thermal Aggregation of Calcium-
- 807 Fortified Skim Milk Enhances Probiotic Protection during Convective Droplet Drying. J. Agric.
- 808 Food Chem. 64, 6003–6010. doi:10.1021/acs.jafc.6b02205
- 809 Watterson, M.J., Kent, D.J., Boor, K.J., Wiedmann, M., Martin, N.H., 2014. Evaluation of dairy
- 810 powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. J.
- 811 Dairy Sci. 97, 1–12. doi:10.3168/jds.2013-7363
- 812 Xueyong, Z., Jianping, D., Jianbao, G., Ziniu, Y., 2008. Activity-loss characteristics of spores
- 813 of Bacillus thuringiensis during spray drying. Food Bioprod. Process. 86, 37-42.
- 814 doi:10.1016/j.fbp.2007.10.017
- 815 Zoccal, R., 2016. Conjuntura atual da produção de leite no mundo [WWW Document]. URL
- 816 http://www.baldebranco.com.br/conjuntura-atual-da-producao-de-leite-no-mundo/ (accessed
- 817 6.6.17).

# CAPÍTULO 4

# Impacto de estresses térmicos subletais na recuperação de esporos de Bacillus cereus após secagem de leite integral por spray drying e estocagem por 180 dias

Artigo formatado conforme normas de submissão da revista: "Applied and Enviromental Microbiology"

1	Impacto de estresses térmicos subletais na recuperação de esporos de <i>Bacillus</i>
2	cereus após secagem de leite integral por spray drying e estocagem por 180
3	dias
4	
5	Verônica O. Alvarenga <sup>1</sup> , Fernanda B. Campagnollo <sup>1</sup> , Rosicléia A. Silva <sup>1</sup> , Miriam D. Hubinger <sup>2</sup> ,
6	Anderson S. Sant'Ana <sup>1#</sup>
7	
8	<sup>1</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade
9	Estadual de Campinas, Brasil
10	<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
11	Universidade Estadual de Campinas, Brasil
12	
13	Running Title: Efeito do estresse subletal na sobrevivência de esporos de Bacillus cereus em
14	processo de secagem
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	#Corresponding author: Prof. A.S.Sant'Ana: and@unicamp.br Rua Monteiro Lobato, 80.
22	Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brazil. Phone: +55(19)
23	3521-2174.

#### **RESUMO** 24

25 Neste trabalho avaliou-se a sobrevivência de esporos de Bacillus cereus ao processo de secagem 26 de leite por spray drying comparando-se a tolerância induzida por processos de estresse térmico 27 subletais aplicados antes do processo de secagem. Esporos de três cepas de B. cereus isoladas 28 de diferentes origens foram submetidas a quatro condições de estresse subletal, sendo que nos 29 tratamentos 1, 2 e 3 foram aplicados choques de calor a diferentes temperaturas (80 °C e 90 °C) 30 com variação nos tempos de exposição de 10 a 30 min; e no tratamento 4 houve a combinação de choque de calor (72 °C/15 s), choque frio a 4 °C/12 h e novo choque de calor a 72 °C/15 s. 31 32 Após o processo de secagem, a contagem dos esporos de *B. cereus* foi dividida em duas frações: 33 uma ativada e uma dormente (choque de ativação 75 °C/20 min). Os leites em pó produzidos 34 foram estocados a temperatura ambiente por 180 dias. Após o período de estocagem as 35 populações de esporos ativados e não ativados foram enumeradas em agar MYP. A aplicação 36 dos tratamentos subletais aumentou a sobrevivência das cepas B63 e 540 ao processo de 37 secagem e a sua persistência nas amostras produzidas após o período de estocagem. As 38 populações de esporos após 180 dias de estocagem variaram entre < 1,0 a 4,4 log<sub>10</sub> esporos/g 39 de massa seca. Esses resultados demonstram a importância do constante monitoramento da 40 qualidade do leite, pois os estresses térmicos ocorridos durante a sua cadeia produtiva podem 41 induzir à termotolerância dos micro-organismos esporulados. 42 43

44

45

46 Palavras-chave: produtos lácteos desidratados, microbiologia quantitativa, patógeno

# 47 INTRODUÇÃO

48 Os dois principais gêneros de bactérias formadoras de esporos de interesse em 49 alimentos são Bacillus e Clostridium. Os Bacillus são responsáveis por aproximadamente 4,0% 50 das doenças de origem alimentar e são um dos principais deteriorantes em alimentos (1-3). 51 Dentro do gênero Bacillus, Bacillus cereus é uma das espécies com maior incidência na cadeia 52 produtiva de leites e derivados (4–7), podendo causar a deterioração desses produtos ou ainda 53 produzir toxinas. Os esporos de B. cereus são encontrados em alta concentração no solo e nas 54 fezes dos animais leiteiros, podendo, portanto, contaminar o leite cru. A capacidade de 55 formação de esporos faz com que essa espécie tenha a habilidade de sobreviver aos processos 56 térmicos comumente aplicados na indústria de produtos lácteos (8). Os esporos de B. cereus 57 são ainda capazes de aderir à superfície dos equipamentos e formar biofilmes, persistindo na 58 linha de processamento (9).

59 Os principais fatores que induzem à termotolerância são a variação da temperatura 60 e o tempo de exposição aos tratamentos subletais (10). Diferentes mecanismos fisiológicos 61 permitem que os micro-organismos esporulados sobrevivam a condições que normalmente 62 seriam letais ou causariam danos às células microbianas vegetativas (11-13). A expressão de 63 chaperonas (proteínas de choque térmico - heat shock protein - HSP) é um mecanismo de 64 resposta ao estresse, geralmente ocorre logo após a exposição ao choque. Essas proteínas podem 65 promover a sobrevivência dos patógenos durante a exposição a elevadas temperaturas (11, 14). 66 Com relação aos esporos, acredita-se que a resistência ao estresse térmico esteja ligada ao baixo 67 conteúdo de água presente no cerne (15). A relação entre a quantidade de água no cerne e a 68 resistência ao calor foi relatada em alguns estudos, os quais indicam que esporos com menor 69 teor de água apresentam maior resistência ao calor (16-18). O estado vítreo e a baixa 70 mobilidade de água no esporo protegem o material celular e evitam a desnaturação de proteínas, 71 tornando-os resistentes ao estresse térmico (19).

Os fenômenos biofísicos, como a estabilidade e a mobilidade proteica, a permeabilidade da membrana e a atividade enzimática estão envolvidos na resistência e na dormência metabólica dos esporos (19). Desta forma, os esporos conseguem sobreviver em alimentos com baixa atividade de água e podem ser encontrados em alta concentração em produtos lácteos desidratados (20–23). Na cadeia produtiva de lácteos, os micro-organismos são frequentemente expostos a estresses químicos, físicos e nutricionais em diferentes magnitudes (24). Uma das condições mais estressantes são os processos que envolvem calor e 79 redução da atividade de água, como no processo produtivo de leite em pó. A presença e a 80 persistência de esporos em leite em pó foram observadas Becker et al (20), Reyes et al (21), 81 Vander Kelen (25) e Miller et al (5). Dessa forma, torna-se fundamental caracterizar o 82 comportamento de populações de esporos submetidos a esse tipo de processamento (20, 21). 83 Todavia, inexistem trabalhos cujos objetivos tenham sido avaliar e quantificar o impacto de 84 estresses térmicos pré-secagem no número de esporos sobreviventes no leite integral em pó. 85 Considerando-se a resistência térmica de esporos de B. cereus e a sua incidência 86 em produtos lácteos, propôs-se avaliar a sobrevivência dos esporos de três cepas de B. cereus 87 submetidas a diferentes condições de estresse que precederam a secagem por spray drying,

88 considerando-se a variação na sensibilidade e a resposta aos tratamentos aplicados.

# 89 MATERIAL E MÉTODOS

#### 90 Cepas de <u>Bacillus cereus</u> e preparo das suspensões

91 Três cepas de *B. cereus* isoladas de diferentes alimentos como chocolate (cepa 436),
92 refeição pronta (cepa B63) e produto lácteo (cepa 540) foram usadas neste trabalho. As cepas
93 selecionadas apresentam diferentes perfis de resistência ao processo de secagem por *spray*94 *drying*. (Dados não apresentados).

95 A metodologia utilizada para o preparo das suspensões foi descrita por Pflug (26), 96 Peña (9) e Martinez (27). A cepas de B. cereus foram inoculadas, separadamente, em caldo 97 nutriente (Kasvi, Curitiba, Brasil) suplementado com sulfato de manganês (10 ppm) (Synth, 98 Diadema, Brasil) e incubadas a 30 °C por 24 h. Decorrida a incubação, foram inoculadas em 99 superfície em garrafas de Roux (Uniglass, São Paulo, Brasil) contendo ágar nutriente (Kasvi, 100 Curitiba, Brasil) adicionado de sulfato de manganês (10 ppm) e incubadas a 30 °C por 30 dias. 101 Durante a incubação, foi realizado exame microscópico diariamente com coloração de verde de 102 malaquita. A lavagem da suspensão foi realizada quando a esporulação atingiu 90%. O 103 procedimento de lavagem foi realizado com água destilada estéril seguida de centrifugação 104 (1500 × g por 20 min a 4 °C) (Sorvall Legend XTR Thermofischer, Waltham, EUA). Os esporos 105 foram ressuspendidos também em água destilada estéril e estocados a -20 °C até o uso.

106

#### 107 Inoculação do leite

As amostras de leite pasteurizado integral [3,5% (v/v) gordura] foram testadas com relação à presença de esporos de *B. cereus* de acordo com a metodologia proposta por Bennet, Tallent, Hait (28). As amostras de leite integral utilizadas apresentaram contagem < 10 esporos/g de *B. cereus*. Um total de 500 g de leite integral foi inoculado com cada suspensão de cada cepa de *B. cereus*, separadamente, visando-se atingir a concentração de 7,3 ± 0,1 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca.

114

### 115 Tratamentos subletais

Para a avaliação da resposta ao estresse dos esporos de *B. cereus* foram testadas 4 condições baseadas em Smelt et al. (29), sendo elas: 1: 90 °C por 10 min; 2: 90 °C por 10 min com 3 choques sucessivos; 3: 80 °C por 30 min; e 4: 72 °C por 15 s, seguido de estocagem a 4 °C por 12 h e novo choque térmico a 72 °C por 15 s. Os estresses subletais definidos por Smelt et al (29) foram condições que induziram a ativação e a germinação de esporos. As condições 122

121

testadas simulam estresses térmicos sofridos na cadeia produtiva de produtos lácteos e derivados. A condição de secagem sem tratamento subletal foi avaliada no Capítulo 2.

123 Para todos os tratamentos, a temperatura inicial da amostra foi mantida a  $20 \pm 2$  °C 124 e o leite inoculado foi acondicionado em sacos estéreis de polietileno de alta densidade, com 125 capacidade nominal de 720 mL (Nasco, Fort Atkinson, EUA). Para cada tratamento foi utilizado 126 500g de leite integral pasteurizado. Nos tratamentos 1, 2 e 3, as amostras foram submetidas a 127 tratamento térmico em banho de água (Fisatom, Modelo 550, São Paulo, Brasil) e a temperatura 128 do banho foi ajustada na respectiva temperatura do tratamento com uma variação de  $\pm 0.5$  °C. 129 Após o tratamento, as amostras foram resfriadas até  $20 \pm 2$  °C em banho de gelo. Para o 130 tratamento 4, o leite inoculado foi submetido ao choque térmico de 72 °C por 15 s, sendo que 131 o tempo foi medido a partir do momento em que a temperatura atingiu  $72 \pm 2$  °C, seguido de 132 resfriamento a 20 °C em banho de gelo. Após o primeiro estresse térmico, a amostra foi 133 incubada a 4 °C por 12 h. Decorrido o tempo de incubação, o segundo choque térmico foi 134 aplicado seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para o primeiro choque térmico.

135

#### 136 Processo de secagem por spray drying

137 As amostras de leite inoculado, submetidas aos tratamentos de estresse subletais, 138 foram secas em spray dryer em escala laboratorial (LabMaq, Modelo SD 1.0, Ribeirão Preto, 139 Brasil). Os parâmetros de secagem foram: temperatura de entrada de ar (190 ± 2 °C), vazão do ar de secagem (84 m<sup>3</sup>/h), vazão de alimentação (7  $\times$  10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>/h), vazão do ar comprimido 140 141 (2,4 m<sup>3</sup>/h), pressão do ar comprimido (0,25 MPa) e temperatura de saída (110  $\pm$  5 °C). Os 142 processos de secagem foram iniciados após o equipamento atingir as condições de equilíbrio, 143 temperatura da entrada do ar de secagem à 190 °C estável por 15 minutos. Para o processo de 144 secagem, 500g de leite integral inoculado ou não com esporos foi acondicionado em um frasco 145 reagente estéril com tampa de rosca e com um orifício 6 mm de diâmetro para a inserção da 146 mangueira de alimentação. O leite em pó foi coletado em um frasco reagente estéril rosqueado 147 na saída do ciclone. O leite em pó recuperado ao final do processo de secagem foi analisado e 148 a concentração de esporos de B. cereus por grama de pó foi determinada. Adicionalmente, 149 foram realizados dois experimentos nas mesmas condições descritas para cada tratamento, 150 entretanto utilizando-se leite sem a inoculação de esporos.

Após cada processo de secagem, o *spray dryer* (câmara de secagem, bico aspersor,
ciclone, tubulações e mangueiras) foi lavado, higienizado e esterilizado. O procedimento de

153 lavagem consistia na imersão em solução 1,0% (v/v) de detergente alcalino Divostar Quatro<sup>®</sup> 154 (Diversey, São Paulo, Brasil) por 30 min a 30 °C, e enxágue com água. Em seguida, era realizada imersão em solução 0,5% (v/v) de detergente ácido Divostar Pascal® (Diversey, São 155 156 Paulo, Brasil) por 20 min a 30 °C sendo enxaguado com água novamente. Para a sanitização, o equipamento foi imerso em solução 0,25% (v/v) de ácido peracético Divostar Forte<sup>®</sup> (Diversey, 157 158 São Paulo, Brasil) por 20 min. Após sanitização, o equipamento foi enxaguado com água e 159 esterilizado a 121 °C por 40 min. Outras medidas de segurança adotadas foram: instalação de 160 um filtro na saída de exaustão de ar do equipamento, antes da descarga do ar no ambiente; e 161 alocação do equipamento em uma sala fechada, a qual era limpa e desinfetada com cloreto de 162 benzalcônio 10% (v/v) antes e após cada processo.

163

#### 164 Enumeração dos esporos de <u>Bacillus cereus</u>

165 A concentração de esporos de B. cereus foi determinada antes e após cada 166 tratamento subletal e após o processo de secagem de acordo com a metodologia proposta por 167 Bennet, Tallent, Hait (28). Antes de cada tratamento subletal, uma amostra de 5 g foi retirada e 168 diluída em 45 mL de tampão citrato de sódio. A amostra foi submetida a choque térmico a 169 80 °C por 30 min (condição ótima para a recuperação de esporos antes do processo de secagem, 170 de acordo com dados preliminares não apresentados), foram preparadas diluições decimais 171 seriadas e o plaqueamento foi feito em agar MYP (Manitol Gema de Ovo Polimixina) 172 (Acumedia, Lansing, USA), sendo as placas incubadas a 30 °C por 48 h. Colônias 173 características: esféricas, planas, com coloração rósea e com formação de halo de lecitinase. 174 Após a contagem, 5 colônias com características típicas foram selecionadas e submetidas à 175 testes bioquímicos, como resistência a lisozima, decomposição da tirosina e coloração de Gram 176 conforme metodologia descrita por Bennett et al (28)

177 Após os tratamentos subletais e depois do processo de secagem, as contagens de 178 esporos de B. cereus foram realizadas de duas formas, uma com choque térmico na amostra e 179 outra sem choque térmico na amostra. Os resultados foram expressos em esporos ativados por 180 choque térmico, para a fração de esporos submetidos ao choque térmico e esporos não ativados 181 para a fração sem choque térmico. Para a fração não ativada foram coletados 5 g de leite 182 inoculado após o tratamento subletal e 1 g de leite em pó após o processo de secagem, 183 preparadas diluições decimais seriadas em tampão citrato de sódio (Dinâmica, Diadema, São 184 Paulo), as quais foram plaqueadas em ágar MYP e incubadas a 30 °C por 48 h. Para a fração 185 ativada por choque térmico, a diluição preparada com tampão citrato de sódio a partir da 186 amostra de leite inoculada era submetida ao choque térmico a 75 °C por 20 min (condição ótima 187 para recuperação de esporos após o processo de secagem, de acordo com dados preliminares 188 não apresentados. Após o choque térmico, foram realizadas diluições decimais seriadas em 189 tampão citrato de sódio seguido por plaqueamento em agar MYP e incubação a 30°C por 48 h. 190 Foram contadas colônias típicas, com as seguintes características, esféricas, planas, com 191 coloração rósea e com formação de halo de lecitinase. Após a contagem, 5 colônias com 192 características típicas foram selecionadas e submetidas à testes bioquímicos, como resistência 193 a lisozima, decomposição da tirosina e coloração de Gram conforme metodologia descrita por 194 Bennett et al (28). Os resultados foram expressos em esporos por grama de leite e 195 posteriormente convertidos em esporos por grama de massa seca, baseado teor de sólidos na 196 entrada e na saída do processo de secagem.

A determinação do teor de umidade nas amostras foi utilizada para a conversão das
contagens de esporos por grama de leite em esporos por grama massa seca de leite. Para tanto,
o teor de sólidos em cada amostra determinado em balança de infravermelho (Gehaka IV3100,
São Paulo, Brasil) (30).

201

#### 202 Análise do efeito dos tratamentos subletais e do processo de secagem

Para determinar o efeito do processo de secagem por *spray drying*, foi calculado o
 número de reduções (γ) para cada cepa, baseado na concentração de esporos por massa seca de
 amostra antes e após o processo de secagem (Equação 1).

$$\gamma = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \tag{1}$$

207

206

#### Estocagem e recuperação de esporos de <u>Bacillus cereus</u> em leite em pó

208 As amostras de leite em pó obtidas através dos processos de secagem por spray 209 drying foram estocadas em embalagens de polietileno de alta densidade, com baixa 210 permeabilidade ao oxigênio e barreira a luz (Nasco, Fort Atkinson, EUA). As embalagens foram 211 mantidas a temperatura ambiente (25 °C) em dessecador de vidro contendo sílica gel (Dinâmica, 212 Diadema, São Paulo) por 180 dias, considerando a metade do período de vida útil do leite em 213 pó. Após esse período, as amostras foram submetidas à análise microbiológica para contagem 214 de esporos de B. cereus. Em cada amostra foi determinado o número de esporos ativados por 215 choque térmico e de esporos não ativados seguindo procedimentos de contagem de esporos

ativados e não tratados conforme metodologia adaptada de Bennet et al (31) descritaanteriormente.

218

#### 219 Análises estatística

220 O efeito dos tratamentos subletais e dos choques de ativação sobre a variação na

sobrevivência das cepas foi testado através de análise de variância (ANOVA) e as comparações
entre as médias através de teste de Tukey *post hoc* considerando-se o valor crítico de p < 0,05.</li>

As análises foram realizadas no Software R (Versão 3.3.1) (*The R Foundation for Statistical* 

224 Computing Viena, Áustria).

### 225 **RESULTADOS**

#### 226 Efeito do estresse em <u>Bacillus cereus</u> provocado pelos tratamentos subletais

227 Tratamentos subletais com choques de calor

Para todos os tratamentos subletais 1, e 2 e 3, as amostras de leite integral inoculadas com a suspensão de esporos de *B. cereus* apresentaram contagem inicial média (N<sub>0</sub>) de 7,3  $\pm$  0,1 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca. Na Figura 1 estão descritas as variações na população de esporos ativados por choque térmico e não ativados após cada tratamento subletal aplicado para as diferentes cepas de *B. cereus* (N<sub>1</sub>), assim como a contagem de esporos após o processo de secagem por *spray drying* (N<sub>F</sub>).

234 No tratamento subletal 1 (choque térmico 90 °C/ 10 min), para a cepas 436 e 540, 235 o  $\gamma$  da população de esporos ativados foi de 1 ciclo logarítmico. Enquanto, a população de 236 esporos ativados da cepa B63 não foi reduzida ( $\gamma = 0$ ) pelo tratamento subletal (Figura 1). O 237 tratamento 2 (3 choques sucessivos de 90 °C por 10 min) reduziu em um ciclo logarítmico ( $\gamma =$ 238 1) a população de esporos ativados, das 3 cepas de *B. cereus*, 436, B63 e 540. Para a cepas 436 239 e 540 a aplicação de choques sucessivos (tratamento subletal 2) ou de um único choque 240 (tratamento subletal 1) alterou  $\gamma$  da população de esporos ativados (p > 0,05). Entretanto, para 241 a cepa B63 a exposição aos sucessivos choques térmicos afetou significativamente o  $\gamma$  (p < 242 0,05) quando comparado à uma única exposição ao choque subletal (tratamento subletal 1). Já 243 o tratamento subletal 3 afetou de forma mais intensa a população de esporos ativados, reduzindo 244 em até 2 ciclos logarítmicos, com exceção da cepa 540 que reduziu apenas 1 ciclo log. 245 Considerando-se ainda as diferenças estatísticas para cada cepa entre os tratamentos subletais 246 aplicados, nota-se que para a cepa 436, o efeito do tratamento 3 ( $\gamma$ = 2) foi significativamente 247 maior que dos tratamentos 1 e 2 ( $\gamma = 1$ ) (p < 0,05). No entanto, para a cepa B63, essa diferença 248 significativa foi observada entre todos os tratamentos aplicados (p < 0.05).

249 Para a população de esporos não ativados (contados diretamente após a aplicação 250 de tratamento subletal), pode-se observar que a linhagem 436 apresentou respostas semelhantes 251 nos tratamentos a 90 °C (Tratamentos 1) e 80 °C (Tratamento 3), com N<sub>1</sub> (contagem após 252 choque subletal) de aproximadamente 5,0  $\log_{10}$  esporos/g de massa seca. Para a cepa 540, o N<sub>1</sub> 253 foi 5,0 log<sub>10</sub> esporos/ g de massa seca quando o tempo de exposição foi mantido em 30 min, 254 independente da variação da temperatura de 80 °C para 90 °C. Já para a cepa B63 foi observado 255 nos tratamentos a 90°C (Tratamento 1 e 2), uma população N<sub>1</sub> de aproximadamente 5,0 log<sub>10</sub> 256 esporos/g de massa seca (Figura 1). Em comparação ao tratamento sem estresse subletal



2.0

0.0

8.0

6.0

4.0

2.0

0.0

Log N (esp/g peso seco)

N0

R.

N0

N1

N1

NF

NF

2.0

0.0

8.0

6.0

4.0

2.0

0.0

Log N (esp/g peso seco)

N0

N0

N1

N1

NF

NF

260 Figura 1. Sobrevivência de Bacillus cereus (cepas 436, B63 e 540) em leite integral após 261 exposição a diferentes condições de estresses térmicos subletais (N1) e após o processo de 262 secagem por spray drying (N<sub>F</sub>), sendo N<sub>0</sub> a contagem antes de cada tratamento subletal. Pontos 263 preenchidos representam a contagem de esporos não ativados e pontos vazios representam a 264 contagem de esporos ativados (choque 75 °C/20 min após tratamento subletal)

257 (Capítulo 2), as condições de estresse testadas neste capítulo aumentaram a capacidade de 258 sobrevivência dos esporos de B. cereus das cepas 540, B63 e 436.

259

2.0

0.0

8.0

Log N (esp/g peso seco) 7.0 V (esp/g peso seco) 7.0 V (esp/g peso seco)

0.0

Cepa 540

N0

B.

N0

N1

N1

NF

NF

265 No tratamento subletal 1 não houve diferença na população de esporos não ativados 266 entre as cepas 436 e B63, o N<sub>1</sub> foi de 5,5 e 5,4  $\log_{10}$  esporos/ g de massa seca, respectivamente. 267 No entanto, o comportamento da cepa 540 foi diferente para o tratamento subletal 1, pois o N<sub>1</sub> 268 foi 7,1 log10 esporos/ g de massa seca. Já para o tratamento 2, observou-se que a contagem de 269 esporos não ativados das cepas B63 e 540 não diferiu (p < 0.05) com o N<sub>1</sub> de 5.8 log10 esporos/g 270 de massa seca. Com relação ao tratamento 3, as cepas 436 e 540 apresentaram uma população 271 de esporos não ativados, após choque subletal (N1) de 5,5 e 5,2 log10 esporos/ g de massa seca, 272 respectivamente.

273 A população de esporos ativados após o processo de secagem (NF) para o 274 tratamento 1 foi de aproximadamente 4,0 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca para as três cepas 275 testadas. No tratamento 2, após o processo de secagem (N<sub>F</sub>), a cepa que apresentou menor 276 contagem foi a B63 com 4,6 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca, sendo que as populações de esporos 277 ativados das cepas 436 e 540 foram de 5,1 e 5,4 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca, respectivamente. 278 Para o tratamento 3, o maior N<sub>F</sub> observado foi para a cepa 540 com 5,2 log<sub>10</sub> esporos/g massa 279 seca, enquanto que as cepas 436 e B63 apresentam população de aproximadamente 4,0 log<sub>10</sub> 280 esporos/g de massa seca. As condições de estresse antes do processo de secagem influenciam 281 significativamente (p < 0.05) na população de esporos ativados após o processo de secagem.

282 A população de esporos ativados após o processo de secagem (N<sub>F</sub>) no tratamento 1 283 variou entre 4,6 (cepa 540) e 5,6 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca (cepa 436). Para o tratamento 284 2, não houve diferença entre a população (NF) observada para as cepas 436 e B63 (5,0 log10 285 esporos/g de massa seca), no entanto, a cepa 540 apresentou uma população um ciclo 286 logarítmico menor que as outras duas cepas. Já para o tratamento 3, o menor N<sub>F</sub> foi observado 287 para a cepa 436, com uma população de esporos dormentes de 4,9 log<sub>10</sub> esporos/g de massa 288 seca, sendo que as cepas B63 e 540 apresentaram população de 5,3 log<sub>10</sub> esporos/g de massa 289 seca. Assim como para os esporos ativados, a sobrevivência da população de esporos não 290 ativados após o processo de secagem foi influenciada significativamente (p < 0.05) pelo 291 tratamento subletal aplicado antes da secagem.

#### 292 Tratamento subletal com choques de calor e frio

293 O último tratamento subletal consistiu na alternância de frio e calor, aplicando-se 294 aquecimento a 72 °C/15 s, seguido de incubação a 4 °C/12 h e aquecimento a 72 °C/15 s. A 295 Figura 2 apresenta as contagens das frações de esporos ativados e não ativados após os 296 tratamentos subletais. Assim como nos tratamentos 1, 2 e 3, a população inicial média (N<sub>0</sub>) no 297 leite integral foi de 7,3  $\pm$  0,1 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca. A população de esporos ativados 298 após o primeiro estresse subletal (N<sub>1</sub>) variou de 5,6 (cepa 436) a 7,3 (cepa B63)  $\log_{10}$  esporos/g 299 de massa seca. Após o período de incubação a 4°C/12 h (N<sub>2</sub>), houve redução de 3 ciclos 300 logarítmicos nas populações de esporos ativados das cepas B63 e 540 (Figuras 2B e 2C). A 301 exposição ao segundo choque térmico (72 °C / 15 s) não levou a redução ( $\gamma = 0$ ) na população 302 de esporos ativados da cepa B63.

303 Considerando-se a população de esporos não ativados, resultantes do primeiro 304 estresse subletal (choque 72 °C/ 15 s) observou-se uma variação na contagem N1 de 7,3 log10 305 esporos/ g de massa seca (cepa B63) a 5,7  $\log_{10}$  esporos/g de massa seca (cepa 436). Após a 306 incubação a 4 °C por 12 h, as populações de esporos não ativados (N2) das cepas 436 e 540 foi 307 7,2 log<sub>10</sub> esporos/ g de massa seca. A exposição das cepas 436 e 540 ao frio indicou um aumento 308 na população de esporos não ativados, com  $\gamma = -1.6$  e -0.6, respectivamente. Contrariamente, 309 nesta mesma condição (4 °C/ 12 h), a população de esporos não ativados da cepa B63 310 apresentou  $\gamma = 2$ . O segundo choque a 72 °C/15 s não afetou a população de esporos ativados 311 das 3 cepas testadas ( $\gamma = 0$ ) (Figura 2).

312Não foram observadas diferenças significativas entre as populações N1 de esporos313ativados e não ativados para todas as cepas (p > 0,05). Entretanto, para a contagem N2 (após314incubação a 4 °C por 12 h) as duas frações de esporos diferiram significativamente (p < 0,05)</td>315para todas as cepas testadas. O mesmo efeito foi observado para a população N3, com exceção316da cepa B63 que não apresentou diferença significativa entre a população de esporos ativados317e esporos não ativados.

A contagem de esporos ativados após o processo de secagem foi significativamente diferente para as cepas testadas (p < 0,05). A população de esporos ativados para a cepa 436 foi 4,9 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca, para a cepa B63 3,9 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca e para a cepa 540 3,6 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca. A população de esporos não ativados diferiu, a menor população foi observada para a cepa 540 com 2,5 log<sub>10</sub> esporos/g de massa seca (p <0,05).



Figura 2. Sobrevivência de esporos *Bacillus cereus* em leite integral [cepas 436 (A), B63 (B) e 540 (C)], antes e após o processo de secagem por *spray drying* depois de exposição a diferentes condições de estresses térmicos subletais: choque 72 °C/15 s (N<sub>1</sub>); refrigeração a 4 °C/12 h (N<sub>2</sub>); choque a 72 °C/15 s (N<sub>3</sub>); e após o processo de secagem (N<sub>F</sub>). Os pontos preenchidos representam a contagem de esporos não tratados e os pontos vazios representam a contagem de esporos ativados.

332

324

325

#### 333 Efeitos do spray dryer em <u>Bacillus cereus</u>

A Tabela 1 apresenta o número de reduções ( $\gamma$ ) de diferentes cepas de *B. cereus* submetidas aos diferentes tratamentos de estresse subletal seguindo-se secagem por *spray drying*. Os valores de  $\gamma$ , para os esporos ativados, variaram entre 1,9 e 2,7 para a secagem precedida pelo tratamento 1 e de 0,8 a 1,4 para a secagem após aplicação o tratamento 2. Nos processos de secagem precedidos pelos tratamentos 3 e 4 (p < 0,05) o  $\gamma$ , para a população de esporos ativados, variou entre 0,6 e 1,3. (Tabela 1).

A secagem precedida pelo tratamento subletal 1 resultou em  $\gamma = -0,1$  e -0,2 para as cepas 436 e B63, respectivamente. Entretanto, para a cepa 540, no processo de secagem após o tratamento 1, foi observado  $\gamma = 2,6$  na população de esporos não tratados. A sobrevivência ao processo de secagem, após o tratamento 1, diferiu (p > 0,05) para as 3 cepas.

Na secagem após o tratamento 2, o maior  $\gamma$  para a fração de esporos não tratados foi apresentado pela cepa 540 ( $\gamma = 1,7$ ), diferindo significativamente (p < 0,05) do  $\gamma$  das cepas 436 ( $\gamma = 0,4$ ) e B63 ( $\gamma = 0,21$ ). Para a secagem após o tratamento subletal 3, a cepa 540 apresentou um aumento na fração de esporos ativados ( $\gamma = -0,2$ ) após o processo de secagem, enquanto que as cepas 436 e B63 apresentaram  $\gamma = 0,7$  e 1,0, respectivamente. A sobrevivência ao *spray drying* da população de esporos não tratados foi influenciada (p < 0,05) pelo tratamento</li>
subletal que precedeu a secagem do leite.

Após a exposição a sucessivos estresses de calor e frio, a cepa que apresentou o maior número de reduções para a secagem pós tratamento 4 foi a cepa 540 ( $\gamma = 4,70$ ), na população de esporos não tratados. Entretanto, para a população de esporos ativados, a cepa 540 sofreu  $\gamma = 0,9$  no processo de secagem após tratamento subletal 4. O mesmo  $\gamma$  (0,9) foi observado para a população de esporos ativados da cepa B63. Já a cepa 436 teve um  $\gamma = 1,3$  na fração de esporos ativados. O número de reduções decimais causados pela secagem pós estresse subletal (tratamento 4) diferiu (p < 0,05) para as cepas de *B. cereus* avaliadas.

358

359 Tabela 1. Efeito do processo de secagem por *spray drying* a 190 °C após os diferentes 360 tratamentos<sup>1</sup> de estresse subletal no número de reduções ( $\gamma$ ) de esporos de *Bacillus cereus*.

Cepas de <i>B. cereus</i>				
436	B63	540		
Tratamento 1				
$2,0 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,0$		
$-0,1 \pm 0,0$	$-0,2 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,0$		
	Tratamento 2			
$1,0 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$		
$0,4 \pm 0,00$	$0,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$		
	Tratamento 3			
$0,9 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,1$		
$0,7 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$	$-0.2 \pm 0.1$		
	Tratamento 4			
$1,3 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,1$		
$1,9\pm 0,1$	$1,1 \pm 0,09$	$4,7 \pm 0,1$		
	436 $2,0 \pm 0,1$ $-0,1 \pm 0,0$ $1,0 \pm 0,1$ $0,4 \pm 0,00$ $0,9 \pm 0,1$ $0,7 \pm 0,3$ $1,3 \pm 0,4$ $1,9 \pm 0,1$	Cepas de B. cereus436B63Tratamento 1 $2,0 \pm 0,1$ $2,7 \pm 0,1$ $-0,1 \pm 0,0$ $-0,2 \pm 0,1$ Tratamento 2 $1,0 \pm 0,1$ $1,5 \pm 0,1$ $0,4 \pm 0,00$ $0,2 \pm 0,1$ Tratamento 3 $0,9 \pm 0,1$ $0,6 \pm 0,0$ $0,7 \pm 0,3$ $1,0 \pm 0,1$ Tratamento 4 $1,3 \pm 0,4$ $0,9 \pm 0,04$ $1,9 \pm 0,1$ $1,1 \pm 0,09$		

<sup>1</sup>Tratamento 1: 90 °C por 10 min; Tratamento 2: 90 °C por 10 min com 3 choques sucessivos;
Tratamento 3: 80 °C por 30 min; e Tratamento 4: 72 °C por 15 s, seguido de incubação a 4 °C
por 12 h e novamente de choque térmico a 72 °C por 15 s; <sup>2</sup>Ativados: submetidos ao choque
térmico 75 °C/ 20 min após tratamento subletal; <sup>3</sup>Não ativados: contados diretamente após o
estresse subletal sem aplicação de choque térmico.

#### 366 Sobrevivência dos esporos de <u>Bacillus cereus</u> após 180 dias de estocagem

- 367 Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das contagens de *B. cereus* nas
  368 amostras de leite integral em pó estocadas por 180 dias que foram secas por *spray drying*369 precedidos de diferentes tratamentos subletais.
- 370 A sobrevivência dos esporos ativados da cepa 436, durante a estocagem, foi afetada 371 (p < 0,05) pela secagem precedida dos tratamentos 1 e 4 ( $\gamma = 0,8$  e 3,1, respectivamente). Os 372 processos de secagem precedidos pelos tratamentos 2 e 3 não influenciaram (p < 0,05) a 373 sobrevivência dos esporos ativados da cepa 436 no período de estocagem por 180 dias, o  $\gamma$  foi 374 1,3 e 1,2, respectivamente. (Tabela 2)

Para a cepa B63 a sobrevivência da fração esporos não ativados, após 180 dias de estocagem, não diferiu (p > 0,05) para os 4 tratamentos subletais aplicados antes do *spray drying*, o  $\gamma$  variou entre 1,7 (Tratamento 3) e 2,1 (Tratamento 1). Entretanto, a fração de esporos ativados, no período de estocagem foi influenciada (p < 0,05) pelo estresse subletal antes da secagem, o  $\gamma$  variou de > 4,6 (Tratamento 3) a 2,5 (Tratamento 1).

380 Os tratamentos subletais aplicados antes do processo de secagem influenciaram (p 381 > 0,05) a sobrevivência dos esporos ativados da cepa 540, o  $\gamma$  variou de 0,9 (Tratamento 4) a 382 3,2 (Tratamento 3). Na secagem pós tratamento subletal 4 houve o aumento da população de 383 esporos não ativados ( $\gamma = -0,2$ ) para a cepa 540.

Condição do	Cepas		
esporo	436	B63	540
		Tratamento 1	
Ativados <sup>2</sup>	$0,8 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,1$
Não ativados <sup>3</sup>	$1,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
		Tratamento 2	
	$1,3 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$
Não ativados	$1,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
		Tratamento 3	
	$1,2 \pm 0,6$	> 4,6	$3,2 \pm 0,2$
Não ativados	$0,6 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
		Tratamento 4	
	$3,1 \pm 0,2$	> 3,9	$0,9 \pm 0,1$
Não ativados	$3,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$-0.2 \pm 0.1$

Tabela 2. Efeito dos diferentes tratamentos subletais<sup>1</sup> sobre a sobrevivência ( $\gamma$ ) de esporos de *B. cereus* no leite em pó após 180 dias de estocagem.

<sup>1</sup>Tratamento 1: 90 °C por 10 min; Tratamento 2: 90 °C por 10 min com 3 choques sucessivos;
Tratamento 3: 80 °C por 30 min; e Tratamento 4: 72 °C por 15 s, seguido de incubação a 4 °C
por 12 h e novamente de choque térmico a 72 °C por 15 s. <sup>2</sup>Ativados: submetidos ao choque
térmico 75 °C/ 20 min após tratamento subletal; <sup>3</sup>Não ativados: contados diretamente após o
estresse subletal sem aplicação de choque-térmico.

391

### 392 **DISCUSSÃO**

393 A sobrevivência de esporos de B. cereus em produtos lácteos está associada às 394 características da cepa, composição e condições de estocagem do alimento (3). Durante o 395 processamento do leite em pó há variação de temperatura na cadeia produtiva, como na etapa 396 de pasteurização, na concentração e na secagem. A exposição a tratamentos térmicos brandos 397 ou a múltiplos estresses pode afetar a ativação do esporo e aumentar heterogeneidade durante 398 a germinação (13). Diversos mecanismos fisiológicos estão associados a essa característica, 399 também as propriedades protetivas da capa do esporo. (32) e a quantidade de água presente no 400 cerne do esporo. (16, 19).

401 A exposição das cepas a estresses subletais pode aumentar a resistência ao processo 402 de secagem por spray drying (33). As cepas 540 e B63 apresentaram uma maior população de 403 esporos sobreviventes após passarem pelos tratamentos subletais e pelo processo de secagem 404 por spray drying (Figura 1). A indução da termotolerância, por aplicação de tratamento subletal, 405 também foi observada em outras espécies como Escherichia coli (11), Listeria monocytogenes 406 (34), Salmonella (35) e Staphylococcus aureus (36). Todavia, este é o primeiro estudo que relata 407 o aumento da resistência e maior sobrevivência de B. cereus quando submetido às condições 408 subletais antes do processo de secagem por spray drying. Em geral, a exposição ao estresse 409 subletal promove mudanças nos metabólitos e na síntese de proteínas nas células com o objetivo 410 de controlar as condições ambientais adversas (14). Entretanto, para esporos os mecanismos de 411 resposta ao estresse ainda são pouco esclarecidos (16, 37). Alguns autores sugerem que a 412 resistência do esporo está associada à quantidade de água presente no cerne do esporo (38, 39) 413 e também às Acid - Soluble Spore Proteins (SASPs) (40, 41). As SASPs são proteínas 414 sintetizadas na fase de esporulação e degradadas no início do processo de germinação. O DNA 415 do esporo é saturado com as SASPs, que protegem contra os danos causados pelo calor úmido, 416 dessecação e resistência ao peróxido de hidrogênio (16, 40).

A resposta aos tratamentos subletais da cepa 436 foi diferente das outras cepas testadas (B63 e 540). Em estudos de sobrevivência prévio (dados não apresentados), a cepa 436 foi a mais resistente ao processo de secagem, sendo utilizadas as mesmas condições de secagem avaliadas nesse capítulo. No entanto, a exposição prévia aos tratamentos subletais fez com que essa cepa reduzisse a sua capacidade de sobrevivência ao processo de secagem, essa redução na sobrevivência pode estar associada com a degradação das SASPs que são responsáveis pela proteção aos danos causados por estresses físicos. O comportamento observado após a 424 aplicação das condições subletais foi o mesmo observado para as cepas sensíveis quando 425 submetida a secagem sem estresse (dados não apresentados) que apresentaram mais de 3 426 reduções decimais no processo de secagem por spray drying. A resposta do esporo em 427 substratos ricos em nutrientes como o leite pode estar associada à variação em mecanismos regulatórios da expressão de metabólitos, como o operon spoVA<sup>2mob</sup> e a eficiência da 428 429 germinação após a exposição a tratamentos térmicos subletais (42, 43). Alguns autores relatam 430 que para o gênero Bacillus, a exposição a condições subletais modifica a estrutura e causa 431 perdas na quantidade de Ácido Dipicolínico (DPA) depositado no cerne do esporo (32, 37). 432 Essa perda de DPA pode estar associada à ruptura do córtex e da membrana interna que permite 433 o seu vazamento (16). Além disso, há a modificação na expressão das proteínas, promovendo 434 a desnaturação destas e de enzimas ligadas ao processo de germinação dos esporos (16, 44).

435 Cepas psicotróficas de B. cereus já foram isoladas de leite pasteurizado e foram 436 capazes de provocar a deterioração da qualidade do leite após incubação no frio (45). Os 437 tratamentos subletais que avaliaram a influência de choque ao calor e ao frio indicam que cepas 438 540 e 436 são capazes de sobreviver ao estresse frio, pois a população de ativados e não tratados 439 não diminuiu quando expostas ao frio por 12 h. Adicionalmente, a cepa B63 sofreu uma redução 440 decimal na sua população quando incubada nas mesmas condições. As cepas psicotróficas são 441 comuns no grupo filogenético de B. cereus e podem ser consideradas importantes 442 contaminantes em produtos lácteos, já que são capazes de multiplicar em baixas temperaturas 443 (46, 47, 48). A exposição ao estresse frio mostra-se muito efetiva para induzir à termotolerância em cepas de B. cereus em produtos lácteos. Isso é importante pois contribui para o 444 445 desenvolvimento de estratégias que possam reduzir a contaminação desses tipos de produtos. 446 A expressão dessa proteína auxilia na recuperação celular e induz a resposta adaptativa das 447 células em condições de choque frio. As duas cepas que se aclimataram ao choque frio, 436 e 448 540, apresentaram maior persistência durante o período de estocagem.

A cepa B63 se mostrou menos resistente e sua população variou entre 1,0 e 1,9  $\log_{10}$ esporos/g de massa seca para a população de esporos dormentes, enquanto que a população de esporos ativados foi maior que 3,2  $\log_{10}$  esporos/g de massa seca. As populações observadas após o tratamento 4 se mostraram mais homogêneas entre as 3 cepas e variaram entre 1,0 e 2,8  $\log_{10}$  esporos/g de massa seca. O período de estocagem pode permitir germinação de esporos resistentes e sincronização e aumento da proporção de células/esporos mais resistentes. As operações unitárias (pasteurização, concentração, secagem) aplicadas na cadeia produtiva de 456 leite em pó podem levar ao aumento da resistência de esporos de *B. cereus*. Os resultados

- 457 apresentados nesse estudo são muito relevantes, porque o *B. cereus* é formador de biofilmes na
- 458 linha de processamento de lácteos. Assim, a exposição constante a estes estresses pode servir
- 459 como fator para seleção de cepas cada vez mais resistentes. Estas cepas selecionadas, podem
- 460 então sobreviver aos processos térmicos e de secagem e causarem problemas de estabilidade e
- 461 segurança microbiológica em leite em pó e produtos formulados com esta matéria-prima.

# 462 CONCLUSÃO

463 Os micro-organismos são expostos a diferentes condições de estresse ao longo da 464 cadeia produtiva de alimentos, desde o campo até a mesa e também durante a digestão do 465 alimento no trato gastrointestinal. Tais estresses podem ser de diferentes intensidades e 466 induzirem a mecanismos de respostas, resultando muitas vezes no aumento da resistência e 467 virulência de micro-organismos patogênicos. Nesse trabalho, observou-se que a aplicação de 468 estresse térmicos com diferentes magnitudes resultou no aumento da resistência de B. cereus 469 ao processo de secagem de leite em pó por spray drying em até 4 vezes quando comparadas às 470 condições sem estresse subletal descritas no Capítulo 2. O aumento da temperatura e do tempo 471 de exposição aos tratamentos subletais podem induzir o aumento na sobrevivência ao processo 472 de secagem. Os processos de secagem após exposição por 30 min a 80 e a 90 °C aumentaram 473 em 50 e 100 % a sobrevivência dos esporos de *B. cereus*, respectivamente, quando comparados 474 aos resultados apresentados no capítulo 2. A combinação entre choques de calor e de frio 475 aumentou a resistência aos processos de secagem em até 5 vezes, quando comparada as 476 condições sem estresse subletal (Capítulo 2). Apesar das condições desfavoráveis para 477 germinação, os esporos podem permanecer dormentes pelo período de estocagem do leite em 478 pó. Considerando que o B. cereus é dos principais micro-organismos formador de biofilmes na 479 indústria de leites e derivados, a exposição à sucessivos estresses na linha de processamento 480 pode induzir a seleção de cepas cada vez mais resistentes. As cepas selecionadas podem então, 481 sobreviver aos processos térmicos e causarem problemas de estabilidade e segurança 482 microbiológica de leite em pó e produtos formulados com essa matéria-prima.

# 483 **REFERÊNCIAS**

484 1. Galperin MY. 2013. Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiol Spectr*485 1:1–15.

2. Zhang W, Lu Z. 2015. Phylogenomic evaluation of members above the species level
within the phylum Firmicutes based on conserved proteins. *Environ Microbiol Rep* 7:273–281.

Wells-Bennik MHJ, Eijlander RT, den Besten HMW, Berendsen EM, Warda AK,
Krawczyk AO, Nierop Groot MN, Xiao Y, Zwietering MH, Kuipers OP, Abee T. 2016.
Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annu Rev Food Sci Technol*7:457–482.

492 4. Carlin F. 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol* 28:177–
493 182.

Miller RA, Kent DJ, Watterson MJ, Boor KJ, Martin NH, Wiedmann M. 2015. Spore
populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *J Dairy Sci* 98:8492–8504.

497 6. Kumari S, Sarkar PK. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy
498 processing environment. *Food Control* 69:20–29.

499 7. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD.
500 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol* Rev 37:664–698.

Son B. Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD. 2015. The Prevalence
and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Front Microbiol* 6.

9. Peña WEL, de Andrade NJ, Soares NFF, Alvarenga VO, Rodrigues Junior S, Granato
D, Giraldo Zuniga AD, de Souza Sant'Ana A. 2014. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on
stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *Int Dairy* J 34.

507 10. Juneja VK, Novak JS. 2003. Adaptation of Foodborne Pathogens to stress from
508 exposure to physical intervention stragtegies, p. 31–54. In Yousef, AE, Juneja, VK (eds.),
509 *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. CRC Press, Boca Raton.

510 11. Chung HJ, Bang W, Drake MA. 2006. Stress response of *Escherichia coli*. *Compr Rev*511 *Food Sci Food Saf* 5:52–64.

512 12. Ter Beek A, Hornstra LM, Pandey R, Kallemeijn WW, Smelt JPPM, Manders EMM,
513 Brul S. 2011. Models of the behaviour of (thermally stressed) microbial spores in foods: Tools
514 to study mechanisms of damage and repair. *Food Microbiol* 28:678–684.

- 515 13. van Melis CCJ, den Besten HMW, Nierop Groot MN, Abee T. 2014. Quantification of
  516 the impact of single and multiple mild stresses on outgrowth heterogeneity of *Bacillus cereus*517 spores. *Int J Food Microbiol* 177:57–62.
- 518 14. Juneja V, Novak J. 2004. Pathogen resistance and adaptation to heat stress, p. 423–441.
  519 In Griffiths, M (ed.), Understanding Pathogen Behaviour Virulence, *Stress Response and*520 *Resistance*. CRC Press, Boca Raton.
- 521 15. Luu S, Cruz-Mora J, Setlow B, Feeherry FE, Doona CJ, Setlow P. 2015. The Effects of
- 522 Heat Activation on Bacillus Spore Germination, with Nutrients or under High Pressure, with or
- 523 without Various Germination Proteins. *Appl Environ Microbiol* 81:2927–2938.
- 524 16. Tiburski JH, Rosenthal A, Guyot S, Perrier-Cornet J-M, Gervais P. 2014. Water
  525 Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance. *Food Biophys* 9:10–19.
- 526 17. Setlow P. 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not
  527 know. *J Bacteriol* 196:1297–1305.
- 528 18. Sanchez-Salas JL, Setlow B, Zhang P, Li YQ, Setlow P. 2011. Maturation of released
  529 spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during *Bacillus subtilis*530 sporulation. *Appl Environ Microbiol* 77:6746–6754.
- 531 19. Sunde EP, Setlow P, Hederstedt L, Halle B. 2009. The physical state of water in bacterial
  532 spores. *Proc Natl Acad Sci* U S A 106:19334–9.
- 533 20. Becker H, Schaller G, von Wiese W, Terplan G. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods
  534 and dried milk products. *Int J Food Microbiol* 23:1–15.
- Reyes J, Bastias J, Gutierrez M, Rodriguez M. 2007. Prevalence of *Bacillus cereus* in
  dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiol* 24:1–6.
- 537 22. McHugh AJ, Feehily C, Hill C, Cotter PD. 2017. Detection and enumeration of spore538 forming bacteria in powdered dairy products. *Front Microbiol* 8:1–15.
- 539 23. in't Veld P, Soentoro P, Notermans S. 1993. Properties of spores in reference materials
  540 prepared from artificially contaminated spray dried milk. *Int J Food Microbiol* 20:23–36.

541 24. Yousef AE, Courtney PD. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new542 generation foods, p. 1–30. In Yousef, AE, Juneja, VK (eds.), Microbial Stress Adaptation and
543 Food Safety. CRC Press, Boca Raton.

544 25. VanderKelen JJ, Mitchell RD, Laubscher A, Black MW, Goodman AL, Montana AK,
545 Dekhtyar AM, Jimenez-Flores R, Kitts CL. 2016. Short communication: Typing and tracking
546 Bacillaceae in raw milk and milk powder using pyroprinting. J Dairy Sci 99:146–51.

547 26. Pflug IJ. 1999. Microbiology and Engineering of Sterilization Process, 10th ed.
548 University of Minnesota, Environmental Sterilization Laboratory, Minneapolis.

549 27. Martinez RCR, Alvarenga VO, Thomazini M, Fávaro-Trindade CS, Sant'Ana ADS.
550 2016. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin
551 (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*552 in refrigerated milk. LWT - Food Sci Technol 68: 67-75.

553 28. Bennett RW, Tallent SM, Hait JM. 2015. *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* Toxins.
554 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public
555 Health Association.

556 29. Smelt JPPM, Bos AP, Kort R, Brul S. 2008. Modelling the effect of sub(lethal) heat 557 treatment of Bacillus subtilis spores on germination rate and outgrowth to exponentially 558 growing vegetative cells. Int J Food Microbiol 128:34–40.

30. Arslan S, Erbas M, Tontul I, Topuz A. 2015. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. LWT Food Sci Technol 63:685–690.

31. Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. 2013. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus, Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* — United States, 1998
- 2008. Clin Infect Dis 57:425–433.

Brul S, van Beilen J, Caspers M, O'Brien A, de Koster C, Oomes S, Smelt J, Kort R,
Ter Beek A. 2011. Challenges and advances in systems biology analysis of *Bacillus* spore
physiology; molecular differences between an extreme heat resistant spore forming *Bacillus*subtilis food isolate and a laboratory strain. Food Microbiol 28:221–227.

33. Barbosa J, Borges S, Teixeira P. 2015. Influence of sub-lethal stresses on the survival
of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. Food Microbiol 52:77–83.
571 34. Koutsoumanis KP, Kendall P a, Sofos JN. 2003. Effect of Food Processing-Related
572 Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes Society* 69:1–4.

573 35. Melo ANF de, Souza GT de, Schaffner D, Oliveira TCM de, Maciel JF, Souza EL de, 574 Magnani M. 2017. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal 575 conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast 576 meat after exposure to sequential stresses. *Int J Food Microbiol* 251:15–23.

577 36. Cebrián G, Sagarzazu N, Pagán R, Condón S, Mañas P. 2010. Development of stress
578 resistance in Staphylococcus aureus after exposure to sublethal environmental conditions. Int J
579 *Food Microbiol* 140:26–33.

580 37. Ter Beek A, Hornstra LM, Pandey R, Kallemeijn WW, Smelt JPPM, Manders EMM,
581 Brul S. 2011. Models of the behaviour of (thermally stressed) microbial spores in foods: Tools
582 to study mechanisms of damage and repair. *Food Microbiol* 28:678–684.

38. Alderton G, Snell N. 1969. Chemical states of bacterial spores: dry-heat resistance. *Appl Microbiol* 17:745–9.

585 39. Alderton G, Snell N. 1963. Base exchange and heat resistance in bacterial spores.
586 Biochem *Biophys Res* ... 10:139–143.

587 40. Setlow B, Setlow P. 1996. Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. J
588 *Bacteriol* 178:3486–3495.

589 41. Setlow B, Sun D, Setlow P. 1992. Interaction between DNA and alpha/beta-type small,
590 acid-soluble spore proteins: a new class of DNA-binding protein. *J Bacteriol* 174:2312–2322.

42. Berendsen EM, Boekhorst J, Kuipers OP, Wells-Bennik MHJ. 2016. A mobile genetic
element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. *ISME J* 10:2633–2642.

Krawczyk AO, de Jong A, Omony J, Holsappel S, Wells-Bennik MHJ, Kuipers OP,
Eijlander RT. 2017. Spore Heat Activation Requirements and Germination Responses Correlate
with Sequences of Germinant Receptors and with the Presence of a Specific spoVA 2mob
Operon in Foodborne Strains of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 83:e03122-16.

597 44. Brul S, Mensonides FIC, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ. 2008. Microbial
598 systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. *Int J Food Microbiol* 128:16–
599 21.

46. Svensson B, Monthn A, Shaheen R, Andersson MA, Salkinoja-Salonen M,
Christiansson A. 2006. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy
production chain. *Int Dairy J* 16:740–749.

- 47. Palomba R, Formisano G, Arrichiello A, Auriemma G, Sarubbi F. 2017. Development
  of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. *Food Chem* 221:1637–1641.
- 48. Schindler T, Graumann PL, Perl D, Ma S, Schmid FX, Marahiel MA. 1999. The Family
- 609 of Cold Shock Proteins of *Bacillus subtilis*: stability and dynamics in vitro and in vivo. *J Biol*
- 610 *Chem* 274:3407–3413.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

## DISCUSSÃO GERAL

As 12 cepas de *B. cereus* caracterizadas apresentaram uma grande variabilidade em relação à resistência ao processo de secagem por *spray drying*, sendo que foi observado que a sobrevivência ao processo de secagem não está associada à origem de isolamento da cepa. A resistência dos esporos de *Bacillus* sp. pode variar de espécie para espécie, mas também há variabilidade entre cepas de uma mesma espécie, sendo que ainda são poucos os trabalhos que esclarecem esse fenômeno (BERENDSEN *et al.*, 2015; DEN BESTEN; BERENDSEN; *et al.*, 2017b). Alguns autores relatam que a variabilidade está associada às proteínas que estão presentes na capa do esporo (ABHYANKAR *et al.*, 2015; DEN BESTEN; BERENDSEN; *et al.*, 2017b; HORNSTRA *et al.*, 2009).

Os valores D estimados a 110 °C variaram entre 2,8 e 12,5 s, sendo que a variação nos valores D foi significativamente diferente para os dois grupos de resistência ao calor identificados. O grupo com maior resistência térmica apresentou um valor D quatro vezes maior que o grupo mais sensível. Ainda dentro do grupo mais resistente ao calor, observou-se a presença de um grupo com resistência intermediária, uma vez que o valor D desse grupo foi aproximadamente 3 vezes menor que o valor apresentando pela cepa mais resistente. A variabilidade nos dados de resistência térmica implica em uma maior complexidade no processo de modelagem preditiva, na avaliação quantitativa de risco e no desenho de processos térmicos. Portanto, os efeitos da resistência térmica não devem ser desprezados, principalmente quando se trata de uma avaliação quantitativa de risco, pois o impacto na estimativa de probabilidade associada ao consumo pode ser subestimado. A sobrevivência dos esporos após o processamento térmico pode acarretar em germinação do micro-organismo e consequente deterioração (BERENDSEN *et al.*, 2015; DEN BESTEN; BERENDSEN; *et al.*, 2017b).

As características de resistência dos esporos a processos térmicos, em parte estão atribuídas às proteínas presentes na capa que reveste os esporos. Durante a fase de esporulação, o processo de reticulação do esporo, juntamente com a formação da capa, está associado à resistência ao calor úmido. Após a lise da célula-mãe, não há alteração na composição da capa do esporo, portanto a capacidade de resistência ao processo térmico é adquirida durante a formação do endósporo dentro da célula-mãe (ABHYANKAR *et al.*, 2015; SANCHEZ-SALAS *et al.*, 2011). Além disso, as proteínas formadas na capa do esporo não são afetadas durante o processo de maturação (ABHYANKAR *et al.*, 2015), visto que o amadurecimento do esporo está associado à sua própria fisiologia e não aos componentes presentes na célula-mãe

que são liberados para o meio de esporulação (SANCHEZ-SALAS *et al.*, 2011). Contudo, a formação de uma camada adicional durante o processo de esporulação ou a modificação na estrutura do córtex associada a uma enzima dependente de cálcio é necessária para a obtenção de esporos resistentes ao calor (IMAMURA *et al.*, 2011; SANCHEZ-SALAS *et al.*, 2011).

A composição dos meios de aquecimento confere propriedade protetora aos microorganismos, sendo que a concentração de sólidos não gordurosos tem maior influência na sobrevivência de micro-organismos do que substratos com elevado teor de lipídeos (Mazas et al., 1999). Esse efeito pode ser atribuído à redução da atividade de água (SANTILLANA FARAKOS; SCHAFFNER; FRANK, 2014). Considerando-se a atividade de água dos três meios avaliados (suspensão de talco  $0.998 \pm 0.002$ , PBS  $0.992 \pm 0.001$  e leite integral  $0.995 \pm$ 0,002), esperava-se que o comportamento de inativação fosse semelhante, entretanto, apenas a suspensão de talco e PBS apresentaram padrões de inativação semelhantes. Sendo assim, a composição do meio de aquecimento e o efeito da atividade de água devem ser considerados para a caracterização dos padrões de inativação. Comparativamente, os valores D a 90 °C observados para as cepas 540 3 B63 em leite integral foram superiores a 20 min. Na literatura, os valores D a 90 °C para B. cereus em leite e produtos lácteos variam entre 1,1 e 20,7 min (MAZAS, M et al., 1999; STOECKEL et al., 2013; ZHANG, Z. et al., 2012). Na Figura 2 do Capítulo 3 estão os valores z encontrados para esporos de B. cereus nos diferentes meios de aquecimento analisados, sendo que esses valores variaram de 9,67 a 10,63 °C para a cepa 436, de 10,51 a 14,90 °C para a cepa 540 e de 10,18 a 11,59 °C para a cepa B63. Considerando-se o meio de aquecimento, o valor z para o leite integral variou em menos de 1 °C para as três cepas avaliadas, já para o tampão fosfato e a suspensão de talco essa variação foi de cerca de 3 °C e 5 °C, respectivamente.

A temperatura de entrada do ar no processo de secagem reflete as propriedades de evaporação da água, que ocorre rapidamente e a uma taxa constante (XUEYONG *et al.*, 2008). Nessa etapa, o choque térmico promove a perda de água na gotícula aspergida, sendo que esse fenômeno limita a inativação microbiana (FU; CHEN, 2011; HUANG; VIGNOLLES; *et al.*, 2017; XUEYONG *et al.*, 2008). A partir da formação da partícula, ocorre a difusão do calor para a parte interna da mesma, onde o processo é mais lento, visto que a temperatura no centro da partícula tende a se aproximar da temperatura de saída do processo. Nesta etapa, há o efeito do calor na inativação microbiana, que é comumente expressado com uma cinética de primeira ordem. Considera-se que a taxa de inativação tem uma relação linear com a temperatura e,

portanto, um aumento na temperatura de saída indica maiores efeitos na inativação dos microorganismos (FU; CHEN, 2011; HUANG; VIGNOLLES; *et al.*, 2017; PERDANA *et al.*, 2013; XUEYONG *et al.*, 2008). Sendo assim, os valores D foram estimados considerando-se a temperatura de saída do *spray dryer* e, dessa forma, as estimativas da distribuição do tempo de residência da partícula foram baseadas em modelos conceituais e teóricos usando-se uma abordagem estocástica (VOEPEL; SCHUMER; HASSAN, 2013). Independente das propriedades dos materiais utilizados para a secagem, dos parâmetros de processo e do equipamento, o comportamento da distribuição do tempo de residência apresenta distribuições probabilísticas típicas.

Alguns estudos sugerem que a sobrevivência de micro-organismos está associada à propriedade do material utilizado como meio para o processo de secagem (ALVES *et al.*, 2016; ATALAR; DERVISOGLU, 2015; HUANG; MÉJEAN; *et al.*, 2017; HUANG; VIGNOLLES; *et al.*, 2017; PAÉZ *et al.*, 2012; PERDANA *et al.*, 2013; POP *et al.*, 2015). A presença de carboidratos no agente carreador pode auxiliar a sobrevivência em condições de anidrobiose, pois promove a estabilização de membranas e proteínas durante o processo de secagem. O mesmo efeito protetivo é observado para o leite, no qual a lactose exerce o papel estabilizador das células microbianas (HUANG; VIGNOLLES; *et al.*, 2017). A remoção de água no processo de secagem leva à alteração na camada lipídica da célula dos micro-organismos, desidratação dos ácidos nucléicos e alteração nos ribossomos. Considerando-se que o esporo bacteriano é uma estrutura altamente desidratada, o efeito da redução de água será pouco efetivo para a inativação do esporo.

A exposição das cepas a alguns tipos de estresse sub-letal pode aumentar a resistência ao processo de secagem por *spray drying* (BARBOSA; BORGES; TEIXEIRA, 2015). Em comparação com os dados observados no Capítulo 2, as cepas 540 e B63 apresentaram uma maior população de esporos sobreviventes após passarem pelos tratamentos subletais e pelo processo de secagem por *spray drying*.

Para esporos os mecanismos de resposta ao estresse ainda são pouco esclarecidos (TER BEEK *et al.*, 2011; TIBURSKI *et al.*, 2014). Alguns autores sugerem que a resistência do esporo está associada à quantidade de água presente no cerne do esporo (ALDERTON; SNELL, 1963, 1969) e também às *Acid - Soluble Spore Proteins* (SASPs) (SETLOW, B.; SETLOW, 1996; SETLOW, B.; SUN; SETLOW, 1992). As SASPs são proteínas sintetizadas na fase de esporulação e degradadas no início do processo de germinação. O DNA do esporo é saturado com as SASPs, que protegem contra os danos causados pelo calor úmido, dessecação e resistência ao peróxido de hidrogênio (SETLOW, B.; SETLOW, 1996; TIBURSKI *et al.*, 2014).

A resposta aos tratamentos subletais da cepa 436 foi diferente das outras cepas testadas (B63 e 540). Nos resultados apresentados no Capítulo 2, a cepa 436 foi a mais resistente ao processo de secagem, sendo utilizadas as mesmas condições de secagem avaliadas no Capítulo 4. No entanto, a exposição prévia aos tratamentos subletais fez com que essa cepa reduzisse a sua capacidade de sobrevivência ao processo de secagem. O comportamento observado após a aplicação das condições subletais foi o mesmo observado para as cepas sensíveis no Capítulo 2, que apresentaram mais de 3 reduções decimais no processo de secagem por spray drying. A resposta do esporo em substratos ricos em nutrientes como o leite pode estar associada à variação em mecanismos regulatórios da expressão de metabólitos, como o operon spoVA<sup>2mob</sup> e a eficiência da germinação após a exposição a tratamentos térmicos subletais (BERENDSEN et al., 2016; KRAWCZYK et al., 2017). Alguns autores relatam que para o gênero Bacillus, a exposição a condições subletais modifica a estrutura e causa perdas na quantidade de Ácido Dipicolínico (DPA) depositado no cerne do esporo (BRUL et al., 2011; TER BEEK et al., 2011). Essa perda de DPA pode estar associada à ruptura do córtex e da membrana interna que permite o seu vazamento (TIBURSKI et al., 2014). Além disso, há a modificação na expressão das proteínas, promovendo a desnaturação destas e de enzimas ligadas ao processo de germinação dos esporos (BRUL et al., 2008; TIBURSKI et al., 2014).

# CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, observou-se uma grande variabilidade na inativação de esporos de *B. cereus* durante a secagem por *spray drying*, sendo identificados dois grupos distintos, um sensível e um resistente. Os resultados deste trabalho sugerem que alguns fatores estão relacionados com a variabilidade dos esporos, dentre eles, as condições de esporulação e principalmente a maturação dos esporos, na qual são formadas as proteínas da capa do esporo que estão associadas à resistência ao calor. Observou-se também a influência dos meios na inativação microbiana, tanto na resistência térmica determinada em tubo capilar quanto nos processos de secagem por *spray drying*. Além da variabilidade na resistência das cepas de *B. cereus*, foi observado diferença nos parâmetros de inativação determinados em tubo capilar e em *spray dryer*, indicando que a extrapolação de parâmetros cinéticos de inativação obtidos em diferentes sistemas de aquecimento não é justificada, dado que a eficiência na transferência do calor ocorre de forma diferente em cada sistema

Os estresses subletais de diferentes intensidades podem induzir mecanismos de respostas, resultando muitas vezes no aumento da resistência e virulência de micro-organismos patogênicos. A aplicação de estresse térmicos com diferentes magnitudes resultou no aumento da resistência de *B. cereus* ao processo de secagem de leite em pó por *spray drying*. O aumento da temperatura e do tempo de exposição aos tratamentos subletais podem induzir diferentes mecanismos de resposta ao estresse. A combinação entre choques de calor e de frio também pode aumentou a resistência aos processos de secagem, em até 5 vezes. Apesar das condições desfavoráveis para germinação, os esporos podem permanecer dormentes pelo período de estocagem do leite em pó.

A variabilidade microbiológica, dependendo do tipo de processamento, será um dos fatores mais relevantes para qualidade microbiológica do produto, pois afetará o nível final de contaminação do alimento. Esse fenômeno é um desafio para a indústria processadora de alimentos, porque não é uma variável controlada, sendo assim, a previsão da variabilidade pode apresentar uma condição mais realística do ambiente de processamento. Dessa forma os resultados apresentados demonstram que a segurança do alimento pode ser comprometida devido às diferenças nas taxas de sobrevivência de *B. cereus* ao processo de produção de leite em pó. A quantificação dessa variabilidade é primordial para que as indústrias entendam o impacto dessa operação unitária, além de contribuir para a busca de práticas que assegurem condições adequadas de segurança dos alimentos formulados a partir de leite em pó.

#### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados apresentados nesta tese são o primeiro passo para entender e caracterizar a variabilidade na sobrevivência de esporos de micro-organismos patógenos em processos de secagem por atomização. A partir da identificação do proteoma dessas cepas será possível caracterizar algumas proteínas com maior expressão e que estão envolvidas no processo de resistência dos esporos à processos físicos. Ao compreender a variabilidade poder-se-á desenvolver novos modelos capazes de considerar este fator e melhor acurácia das predições. Novos estudos poderão compreender os mecanismos envolvidos na transformação da partícula/gotícula e consequentemente a melhor elucidação da sobrevivência de esporos em processos que envolvem transferência de massa e calor.

# REFERÊNCIAS

ABHYANKAR, W. *et al.* Reinforcement of Bacillus subtilis spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation. *Food Microbiology*, v. 45, n. 19, p. 54–62, 2011. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.007">http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.007</a>>.

ABHYANKAR, W. *et al.* Reinforcement of Bacillus subtilis spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation. *Food Microbiology*, v. 45, p. 54–62, 2015. Disponível em: <<u>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002014000604></u>. Acesso em: 3 maio 2017.

ADHIKARI, B. *et al.* Effect of addition of proteins on the production of amorphous sucrose powder through spray drying. *Journal of Food Engineering*, v. 94, n. 2, p. 144–153, set. 2009. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409000363">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877409000363</a>.

ALDERTON, G.; SNELL, N. Base exchange and heat resistance in bacterial spores. *Biochemical and biophysical research* ..., v. 10, n. 2, p. 139–143, 1963. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14011814">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14011814</a>>.

ALDERTON, G.; SNELL, N. Chemical states of bacterial spores: dry-heat resistance. *Applied microbiology*, v. 17, n. 5, p. 745–9, 1969. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=377793&tool=pmcentrez&rende">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=377793&tool=pmcentrez&rende</a> rtype=abstract>.

ALVES, N. N. *et al.* Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. *Journal of Food Engineering*, v. 189, p. 45–54, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877416301947>. Acesso em: 8 maio 2017.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; ISHWARYA, P. Introduction to spray drying. In: ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; ISHWARYA, P. (Org.). . *Spray Drying Techniques for Food Ingredient Encapsulation*. 1st. ed. Chicago: Willey, 2015. .

ARYANI, D. C. *et al.* Quantifying strain variability in modeling growth of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 208, p. 19–29, set. 2015. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515300040">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515300040</a>>.

ATALAR, I.; DERVISOGLU, M. Optimization of spray drying process parameters for kefir powder using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, v. 60, n. 2, p. 751–757, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814006446>. Acesso em: 9 maio 2017.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, n. 3–4, p. 277–294, nov. 1994. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160594901570">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160594901570</a>>. Acesso em: 29 abr. 2017.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. *Food Microbiology*, v. 52, p. 77–83, dez. 2015. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002015001215">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002015001215</a>.

BECKER, H. *et al.* Bacillus cereus in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 1–15, 1994.

BENNETT, R. W.; TALLENT, S. M.; HAIT, J. M. Bacillus cereus and Bacillus cereus Toxins. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. [S.l.]: American Public Health Association, 2015. Disponível em: <http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/MBEF.0222.036>.

BERENDSEN, E. M. *et al.* A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. *The ISME Journal*, v. 10, n. 11, p. 2633–2642, 22 nov. 2016. Disponível em: <a href="http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ismej.2016.59">http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ismej.2016.59</a>>.

BERENDSEN, E. M. et al. Two distinct groups within the Bacillus subtilis group displaysignificantly different spore heat resistance properties. Food Microbiology, v. 45, p. 18–25,2015.Disponívelem:

<a>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002014000847>. Acesso em: 1 maio 2017.</a>

BERNAERTS, K. *et al.* Concepts and tools for predictive modeling of microbial dynamics. *Journal of food protection*, v. 67, n. 9, p. 2041–2052, 2004.

BEUCHAT, L. R. et al. Low–Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. Journal of Food Protection, v. 76, n. 1, p. 150–172, 2013. Disponível

em: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>.

BHANDARI, B. R. Introduction to food powders. In: BHANDARI, B. *et al.* (Org.). *Handbook of Food Powders*. Oxford: Woodhead Publishing, 2013. p. 1–25. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857095138500017">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857095138500017</a>>.

BHANDARI, B. R.; PATEL, K. C.; CHEN, X. D. Spray drying of food materials - process and product characteristics. In: CHEN, X. D.; MUJUMDAR, A. S. (Org.). . *Drying Technologies in Food Processing*. 1st. ed. [S.1.]: Blackwell Publishung, 2008. p. 113–159.

BIRCHAL, V. S.; PASSOS, M. L. Modeling and simulation of milk emulsion drying in spray dryers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n. 2, p. 293–302, 2005.

BRUL, S. *et al.* Challenges and advances in systems biology analysis of Bacillus spore physiology; molecular differences between an extreme heat resistant spore forming Bacillus subtilis food isolate and a laboratory strain. *Food Microbiology*, v. 28, n. 2, p. 221–227, 2011. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010001711">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010001711</a>. Acesso em: 31 maio 2017.

BRUL, S. *et al.* Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, v. 128, n. 1, p. 16–21, 2008. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.029">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.029</a>>.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, NULL, v. 99, n. 2, p. 575–586, fev. 2010. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916303926">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916303926</a>>. Acesso em: 2 mar. 2017.

CAPPUYNS, A.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. M. Modelling microbial inactivation kinetics: primary models. In: VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. M. (Org.). . *Progress on Quantitative Approaches of Thermal Food Processing*. [S.1.]: Nova Science Publishers, 2012. .

CARLIN, F. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, NULL, v. 28,
n. 2, p. 177–182, abr. 2011. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010001838">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010001838</a>. Acesso em: 14 mar. 2017.
CERF, O. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 42, n. 1, p. 1–19, 1977.

CEUPPENS, S.; BOON, N.; UYTTENDAELE, M. Diversity of Bacillus cereus group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 84, n. 3, p. 433–450, 2013.

CHEN, X. . Food drying fundamentals. In: CHEN, X. D.; ARUN S. MUJUMDAR (Org.). . *Drying Technologies in Food Processing*. London: Blackwell Publishing, 2008. p. 1–54.

DEN BESTEN, H. M. W.; ARYANI, D. C.; *et al.* Microbial variability in growth and heat resistance of a pathogen and a spoiler: All variabilities are equal but some are more equal than others. *International Journal of Food Microbiology*, v. 240, p. 24–31, 2017. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.025">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.025</a>>.

DEN BESTEN, H. M. W.; BERENDSEN, E. M.; et al. Two complementary approaches toquantify variability in heat resistance of spores of Bacillus subtilis. International Journal ofFoodMicrobiology,2017a.Disponívelem:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160517301733>.

DEN BESTEN, H. M. W.; BERENDSEN, E. M.; *et al. Two complementary approaches to quantify variability in heat resistance of spores of Bacillus subtilis. International Journal of Food Microbiology.* [S.1: s.n.], 2017b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160517301733>. Acesso em: 28 abr. 2017.

DENS, E. J.; VAN IMPE, J. F. On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 247–260, mar. 2001. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004724">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004724</a>>.

DOLAN, K. *et al.* Thermal processing and kinetic modeling of inactivation. In: BAKALIS, S.; KNOERZER, K.; FRYER, P. J. (Org.). . *Modeling Food Processing Operations*. Cambridge: Elsevier, 2015. p. 37–66. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782422846000027>.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, NULL, v. 44, n. 5, p. 1127–1149, jun. 2011. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911002122">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911002122</a>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Model for Combined Effects of Temperature, pH and Water Activity on Thermal Inactivation of Bacillus cereus Spores.

Journal of Food Science, v. 63, n. 5, p. 887–889, 1998.

GALPERIN, M. Y. Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiology Spectrum*, v. 1, n. 2, p. 1–15, 27 dez. 2013. Disponível em: <a href="http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012">http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012</a>.

GEERAERD, A. H.; HERREMANS, C. H.; VAN IMPE, J. F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 185–209, 2000.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, n. 1, p. 95–105, jun. 2005. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160505000073>">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160505000073></a>.

GOPAL, N. *et al.* The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, dez. 2015.

GRANGER, A. C. *et al.* Effects of Mn and Fe levels on Bacillus subtilis spore resistance and effects of Mn2+, other divalent cations, orthophosphate, and dipicolinic acid on protein resistance to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 1, p. 32–40, 2011.

HEYNDRICKX, M. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Applied and Environmental Soil Science*, v. 2011, p. 1–11, 2011. Disponível em: <a href="http://www.hindawi.com/journals/aess/2011/561975/">http://www.hindawi.com/journals/aess/2011/561975/</a>>.

HORNSTRA, L. M. *et al.* On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of Bacillus spores: Input for a "systems" analysis approach of bacterial spore outgrowth. *International Journal of Food Microbiology*, v. 134, n. 1, p. 9–15, 2009.

HUANG, S.; MÉJEAN, S.; *et al.* Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. *Journal of Food Engineering*, v. 196, p. 11–17, 2017.

HUANG, S.; VIGNOLLES, M.-L.; *et al.* Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 63, p. 1–17, 2017. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416303247">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416303247</a>>. Acesso em: 8

maio 2017.

HUSMARK, U.; RÖNNER, U. Adhesion of Bacillus cereus spores to different solid surfaces: Cleaned or conditioned with various food agents. *Biofouling: The journal of Bioadhesion and Biofilm research*, v. 7, n. 1, p. 57–65, 1993.

IMAMURA, D. *et al.* Proteins involved in formation of the outermost layer of Bacillus subtilis spores. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 16, p. 4075–4080, 2011.

IN'T VELD, P.; SOENTORO, P.; NOTERMANS, S. Properties of spores in reference materials prepared from artificially contaminated spray dried milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 23–36, out. 1993. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016816059390057N">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016816059390057N</a>.

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Predictive Microbiology: A Review. *Biocontrol Science*, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2003. Disponível em: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bio1996/8.1?from=CrossRef>.

JOHNSON, E. A. Microbial Adaptation and Survival in Foods. In: YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. (Org.). . *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. Boca Raton: [s.n.], 2003. .

KOCA, N.; ERBAY, Z.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Effects of spray-drying conditions on the chemical, physical, and sensory properties of cheese powder. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 5, p. 2934–43, 2015. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021500185X">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021500185X</a>>.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 2, p. 189–198, 2000.

KOUTSOUMANIS, K. P.; LIANOU, A. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 7, p. 2294–2301, 2013.

KRAWCZYK, A. O. *et al.* Spore Heat Activation Requirements and Germination Responses Correlate with Sequences of Germinant Receptors and with the Presence of a Specific spoVA 2mob Operon in Foodborne Strains of Bacillus subtilis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 7, p. e03122-16, 1 abr. 2017. Disponível em: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03122-16>. KUMARI, S.; SARKAR, P. K. Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, v. 69, p. 20–29, 2016a. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516301815>. Acesso em: 23 abr. 2017.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, NULL, v. 69, p. 20–29, nov. 2016b. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516301815">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516301815</a>. Acesso em: 3 mar. 2017.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. Prevalence and characterization of Bacillus cereus group from various marketed dairy products in India. *Dairy Science and Technology*, v. 94, n. 5, p. 483–497, 2014.

LAMMERDING, A.; MCKELLAR, R. Predictive Microbiology In Quantitative Risk Assessment. In: MCKELLAR, R.; LU, X. (Org.). . *Modeling Microbial Responses in Foods*. Boca Raton: CRC, 2003. . Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch8>.

LANG, E. *et al.* Modelling the heat inactivation of foodborne pathogens in milk powder : high relevance of the substrate water activity. *Food Research International*, 2017.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Evaluation of the strain variability of Salmonella enterica acid and heat resistance. *Food Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 259–267, 2013. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.009</a>>.

LICARI, J. J. Salmonella Survival During Spray Drying and Subsequent Handling of Skimmilk Powder. II. Effects of Drying Conditions. *Journal of Dairy Science*, v. 53, n. 7, p. 871–876, 1970. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?\_ob=GatewayURL&\_method=citationSearch&\_urlV

ersion=4&\_origin=EXLIBMETA&\_version=1&\_piikey=S0022-0302(70)86310-

X&md5=7fb43bd292fc79134b4c962db504f4ce>.

LOBACZ, A.; KOWALIK, J. A predictive model for listeria monocytogenes in UHT dairy products with various fat content during cold storage. *Journal of Food Safety*, v. 35, n. 1, p. 119–127, 2015.

LUU-THI, H.; KHADKA, D. B.; MICHIELS, C. W. Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of Bacillus cereus. *International Journal of Food* 

*Microbiology*, v. 189, p. 183–188, 2014. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.027">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.027</a>>.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B. Bacillus cereus Spores During Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk\r10.3168/jds.2006-754. *Journal of Dairy Science*, NULL, v. 90, n. 6, p. 2745–2754, 2007. Disponível em: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/90/6/2745>.

MAJED, R. *et al.* Bacillus cereus Biofilms-same, only different. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. JUL, p. 1–16, 2016.

MARKS, B. P. Status of Microbial Modeling in Food Process Models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 7, n. 1, p. 137–143, jan. 2008. Disponível em: <a href="http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2007.00032.x">http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2007.00032.x</a>.

MARTINEZ, R. C. R. *et al.* Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on Listeria monocytogenes and Bacillus cereus in refrigerated milk. *LWT - Food Science and Technology*, v. 68, 2016.

MAZAS, M. *et al.* Heat resistance of Bacillus cereus spores : effects of milk constituents and stabilizing additives. *Journal of Food Protection*, v. 62, n. 4, p. 410–413., 1999.

MAZAS, M. *et al.* Thermal inactivation of Bacillus cereus spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *International Journal of Food Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 61–67, 1999.

MCKELLAR, R.; LU, X. Primary Models. [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <a href="http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch2">http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch2</a>>.

MCMEEKIN, T. *et al.* Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates? *Food Control*, v. 29, n. 2, p. 290–299, 2013.

MCMEEKIN, T. A. *et al.* Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, v. 73, n. 2–3, p. 395–407, mar. 2002. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006638">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006638</a>.

MEMBRÉ, J.-M.; VALDRAMIDIS, V. P. *Modeling Food Microbiology*. 1st. ed. London: Elsevier, 2016.

MILLER, R. A. et al. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are

significantly different. Journal of Dairy Science, v. 98, p. 8492-8504, 2015.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of food technology*, v. 3, p. 41–51, 2000.

NICHOLSON, W. L. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 64, n. 3, p. 548–72, 2000. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>.

OKINAKA, R. T.; KEIM, P. The Phylogeny of Bacillus cereus sensu lato. *Microbiology spectrum*, p. 1–12, 2016.

OWUSU-KWARTENG, J. *et al.* Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of Bacillus cereus sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 65, 2017. Disponível em: <a href="http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0975-9">http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0975-9</a>>.

PAÉZ, R. *et al.* Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, v. 48, n. 2, p. 748–754, 2012.

PEÑA, W. E. L. *et al.* Modelling Bacillus cereus adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *International Dairy Journal*, v. 34, n. 1, 2014.

PERDANA, J. et al. Dehydration and thermal inactivation of Lactobacillus plantarum WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. Food Research International, NULL, 54. 2, 1351-1359, 2013. v. n. p. dez. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005309">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005309</a>>. Acesso em: 13 mar. 2017. PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. Nutrition, v. 30, n. 6, 619–627, jun. 2014. Disponível p. em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900713004607>.

PÉREZ-CHABELA, M. L. *et al.* Effect of Spray Drying Encapsulation of Thermotolerant Lactic Acid Bacteria on Meat Batters Properties. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, n. 6, p. 1505–1515, 27 jun. 2013. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/s11947-012-0865-y">http://link.springer.com/10.1007/s11947-012-0865-y</a>.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A. *Predictive Microbiology in Foods*. New York, NY: Springer New York, 2013. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5520-2">http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5520-2</a>>.

PERIAGO, P. M. *et al.* Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of Bacillus cereus ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 7, p. 3486–3495, 1 jul. 2002. Disponível em: <a href="http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.68.7.3486-3495.2002">http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.68.7.3486-3495.2002</a>>.

PFLUG, I. J. *Microbiology and Engineering of Sterilization Process*. 10th. ed. Minneapolis: University of Minnesota, Environmental Sterilization Laboratory, 1999.

POP, O. L. *et al.* The influence of different polymers on viability of Bifidobacterium lactis 300b during encapsulation, freeze-drying and storage. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 7, p. 4146–4155, 8 jul. 2015. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1441-4">http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1441-4</a>>.

QUIGLEY, L. *et al.* The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 5, p. 664–698, set. 2013. Disponível em: <a href="https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12030">https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/1574-6976.12030</a>>.

RASCH, M. Experimental Design and Data Collection. [S.I: s.n.], 2003. Disponível em: <a href="http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch1">http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch1</a>.

RATKOWSKY, D. A. *et al.* Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, v. 154, n. 3, p. 1222–1226, 1983.

REYES, J.; BASTIAS, J.; *et al.* Prevalence of Bacillus cereus in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, NULL, v. 24, n. 1, p. 1–6, fev. 2007. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006000992">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006000992</a>. Acesso em: 2 mar. 2017.

REYES, J. E.; BASTÍAS, J. M.; *et al.* Prevalence of Bacillus cereus in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 1–6, 2007. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002006000992">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002006000992</a>. Acesso em: 27 abr. 2017.

ROSS, T.; DALGAARD, P. Secondary Models. *Modeling Microbial Responses in Foods*, p. 63–150, 2004.

SADIQ, F. A. *et al.* The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, v. 238, p. 193–201, 2016. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009</a>>.

SANCHEZ-SALAS, J. L. *et al.* Maturation of released spores is necessary for acquisition of full spore heat resistance during Bacillus subtilis sporulation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 19, p. 6746–6754, 2011.

SANTILLANA FARAKOS, S. M.; SCHAFFNER, D. W.; FRANK, J. F. Predicting Survival of Salmonella in Low–Water Activity Foods: An Analysis of Literature Data. *Journal of Food Protection*, v. 77, n. 9, p. 1448–1461, 2014.

SCHIE, I. W.; HUSER, T. Label-free analysis of cellular biochemistry by Raman spectroscopy and microscopy. *Comprehensive Physiology*, v. 3, n. 2, p. 941–956, 2013.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Role of DNA repair in <i>Bacillus subtilis<i/> spore resistance. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 12, p. 3486–3495, 1996.

SETLOW, B.; SUN, D.; SETLOW, P. Interaction between DNA and alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins: a new class of DNA-binding protein. *Journal of Bacteriology*, v. 174, n. 7, p. 2312–2322, 1992. Disponível em: <a href="http://jb.asm.org/content/174/7/2312.short">http://jb.asm.org/content/174/7/2312.short</a>>.

SETLOW, P. Spores of Bacillus subtilis: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, n. 3, p. 514–525, 2006.

SHAHEEN, R. *et al.* Persistence strategies of Bacillus cereus spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 347–355, 2010. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.004">http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.004</a>>.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, v. 65, p. 49–67, 2017. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416306355">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416306355</a>>.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications inPharmaceutical Technology. Journal of Pharmaceutical Sciences, NULL, v. 99, n. 2, p. 587–597,fev.2010.Disponívelem:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916304129>. Acesso em: 2 mar. 2017.

STOECKEL, M. *et al.* Thermal inactivation of Bacillus cereus spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science and Technology*, v. 93, n. 2, p. 163–175, 2013.

SUNDE, E. P. *et al.* The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 46, p. 19334–9, 2009. Disponível em:

<http://apps.webofknowledge.com.proxy.uba.uva.nl:2048/full\_record.do?product=UA&searc h\_mode=GeneralSearch&qid=22&SID=N2SxqNckHIicXUzKxZE&page=2&doc=12>.

TAMPLIN, M.; BARANYI, J.; PAOLI, G. Software Programs To Increase The Utility Of Predictive Microbiology Information\*. [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <a href="http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch6">http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203503942.ch6</a>>.

TENENHAUS-AZIZA, F.; ELLOUZE, M. Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology*, v. 45, n. PB, p. 290–299, 2015. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.026">http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.026</a>>.

TER BEEK, A. *et al.* Models of the behaviour of (thermally stressed) microbial spores in foods: Tools to study mechanisms of damage and repair. *Food Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 678–684, jun. 2011. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010001760">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010001760</a>>.

TIBURSKI, J. H. *et al.* Water Distribution in Bacterial Spores: A Key Factor in Heat Resistance. *Food Biophysics*, v. 9, n. 1, p. 10–19, 2014. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/s11483-013-9312-5">http://link.springer.com/10.1007/s11483-013-9312-5</a>>.

VERMEULEN, A. *et al.* Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of Listeria monocytogenes as a function of pH, aw and acetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, n. 2, p. 83–89, 2009. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.038">http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.038</a>>.

VOEPEL, H.; SCHUMER, R.; HASSAN, M. A. Sediment residence time distributions: Theory and application from bed elevation measurements. *Journal of Geophysical Research: Earth Surface*, v. 118, n. 4, p. 2557–2567, 2013.

WELLS-BENNIK, M. H. J. *et al.* Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 7, n. 1, p. 457–482, 2016. Disponível em: <a href="http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-041715-033144">http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-041715-033144</a>>.

WISNIEWSKI, R. Spray Drying Technology. *International Conference on Environmental Systems*, n. July, p. 1–46, 2015.

WU, W. D. *et al.* Towards spray drying of high solids dairy liquid: Effects of feed solid content on particle structure and functionality. *Journal of Food Engineering*, v. 123, p. 130–135, 2014. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.013">http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.013</a>>.

XUEYONG, Z. *et al.* Activity-loss characteristics of spores of Bacillus thuringiensis during spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, v. 86, n. 1, p. 37–42, 2008.

ZHANG, W.; LU, Z. Phylogenomic evaluation of members above the species level within the phylum F irmicutes based on conserved proteins. *Environmental Microbiology Reports*, v. 7, n. 2, p. 273–281, abr. 2015. Disponível em: <a href="http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12241">http://doi.wiley.com/10.1111/1758-2229.12241</a>.

ZHANG, Z. *et al.* Thermal inactivation of Bacillus cereus spores in infant formula under shear conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 93, n. 2, p. 99–109, 2012. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503006081">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503006081</a>. Acesso em: 10 abr. 2017.

ZOCCAL, R. *Conjuntura atual da produção de leite no mundo*. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/conjuntura-atual-da-producao-de-leite-no-mundo/>. Acesso em: 6 jun. 2017.

ZWIETERING, M. H. *et al.* Modeling of Bacterial Growth Function of Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 1094–1101, 1991.

ANEXO

#### ANEXO A

### DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE CONTEÚDO



Ministério da Educação

Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica Instituto Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 22/08/2017

Declaro para os devidos fins, Verônica Ortiz Alvarenga é autora do capitulo " Microbiologia Preditiva no Processamento de Leite e Derivados, que faz parte da coleção Lácteos o que sou Editor. Autorizo a mesma a usar parte do capitulo na revisão bibliográfica da sua tese de doutorado.

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Vice-Coordenador do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) SIAPE: 2349342

> Prof<sup>®</sup> Adriano Gomes da Cruz Coordenação do Mestrado PCTA Instituto Federal do Nio de Janeiro Matrícula: 2349342.