



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HENRIQUE ISSA MONTANHOLI

**PROPOSIÇÃO DE METODOLOGIAS RÁPIDAS NA DETECÇÃO DE FORMA
LATENTE BACTERIANA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E NARIZ ELETRÔNICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2018

HENRIQUE ISSA MONTANHOLI

**PROPOSIÇÃO DE METODOLOGIAS RÁPIDAS NA DETECÇÃO DE FORMA
LATENTE BACTERIANA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E NARIZ ELETRÔNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos, do Departamento de Alimentos – DALIM-, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de bacharel em Engenharia de Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Márcia Regina Ferreira
Geraldo Perdoncini

CAMPO MOURÃO

2018



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Campo Mourão
Departamento Acadêmico de Alimentos
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

PROPOSIÇÃO DE METODOLOGIAS RÁPIDAS NA DETECÇÃO DE FORMA
LATENTE BACTERIANA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO
PRÓXIMO E NARIZ ELETRÔNICO

por

HENRIQUE ISSA MONTANHOLI

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 22 de Fevereiro de 2018, às 09:30, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em engenharia de Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após a deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr^a. Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini

Prof. Dr. Paulo Henrique Março

Prof. Dr. Rafael Porto Ineu

Nota: O documento original e assinado pela banca examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR campus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, sem o qual, na minha concepção, não teria chegado onde cheguei. Aos meus pais, Hermenegildo Donizete Montanholi e Alexandra Rezende Issa Montanholi, meu irmão Guilherme, meus avôs, minhas avós e também à minha namorada Priscila, que me apoiou desde o início de minha jornada na universidade.

Aos meus amigos Rafinha, Fabinho, João Vitor, Wilson, Hércules, Thiago, Fernando, Lucas e Barreto, que pacientemente me apoiaram durante meu curso.

Aos meus amigos Fernando, Hércules e Thiago um agradecimento especial, pois foi com eles que sofri, me diverti e superei as minhas próprias expectativas durante o curso de Engenharia de Alimentos.

À minha orientadora Márcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini, que tanto me ensinou e auxiliou nos momentos de dificuldade, tornando este trabalho possível.

Ao meu coorientador Evandro Bona, meu amigo Gustavo Makimori, minha amiga Luísa, meu amigo Sílvio e ao professor Paulo Henrique Março, que contribuíram consideravelmente para meu trabalho e sem os quais dificilmente o seria feito.

Aos professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* Campo Mourão, que são os responsáveis pelo aluno e pessoa que me tornei. Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse trilhar o meu caminho.

RESUMO

MONTANHOLI, Henrique Issa. Proposição de metodologias rápidas na detecção bacteriana utilizando Espectroscopia de Infravermelho Próximo e Nariz Eletrônico. 2018. 41f. Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

As bactérias são os microrganismos de maior distribuição na natureza, estando, dentre outros aspectos, envolvidas em processos de produção e deterioração de alimentos e responsáveis por causar inúmeras doenças. Portanto é imprescindível a detecção de suas atividades em diferentes amostras. As metodologias tradicionais para detecção bacteriana demandam tempo, são suscetíveis a erros e podem ser onerosas. O desenvolvimento tecnológico tem proporcionado a construção de equipamentos com elevada capacidade na predição de componentes amostrais de forma rápida e confiável. O presente trabalho teve como objetivos a obtenção e padronização de suspensão de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) para posterior análise das variações químicas amostrais utilizando os equipamentos para Espectroscopia de Infravermelho Próximo e Nariz Eletrônico associados ao método quimiométrico de Análise de Componentes Principais ou *Principal Component Analysis*, (PCA). O nariz eletrônico foi capaz de identificar variações no perfil de voláteis das amostras apenas dezoito minutos após o inóculo dos esporos em meio de crescimento, gerando sinais associados a hidrocarbonetos, ácidos, etanol vapores orgânicos e cetona. A partir dos dados espectrais da região do infravermelho próximo observou-se diferença dos perfis amostrais cerca de uma hora após o início do experimento, apresentando vibrações nas regiões de sobretons terciários de RNH_2 (1050nm), Ar-OH (930nm), H_2O (940nm) e R-OH (950nm), e sobretons secundários referentes a carbono saturado (1150nm). Os componentes possivelmente presentes nas amostras apresentaram boa relação com os relatados na literatura e também foram condizentes comparando os valores obtidos entre as técnicas utilizadas. Os resultados mostraram que as técnicas aplicadas apresentam velocidade e confiabilidade na predição de componentes amostrais, podendo contribuir para análise de compostos e também auxiliando na área da saúde relacionada à diagnósticos clínicos.

Palavras-chave: NIR, nariz eletrônico, PCA, *Geobacillus stearothermophilus*.

ABSTRACT

MONTANHOLI, Henrique Issa. Proposition of fast methodologies in bacterial detection using Near Infrared Spectroscopy and Electronic Nose. 2018. 41f. Departamento Cadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

Bacteria are the most widely distributed microorganisms in nature, being, among other aspects, involved in processes of production and deterioration of food and responsible for causing numerous diseases. Therefore it is essential to detect their activities in different samples. Traditional methodologies for bacterial detection require time, are susceptible to errors and can be costly. The technological development has provided the construction of equipment with high capacity in the prediction of sample components quickly and reliably. The objective of the present work was to obtain and standardize spore suspension of *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC® 7953™) for further analysis of the chemical sample variations using the equipment for Near Infrared Spectroscopy and Electronic Nose associated with the Chemometric method of Principal Component Analysis or Principal Component Analysis, (PCA). The electronic nose was able to identify variations in the volatiles profile of the samples only eighteen minutes after the inoculum of the spores in growth medium, generating signals associated with hydrocarbons, acids, ethanol, organic vapors and ketone. From the spectral data of the near-infrared region, differences from the sample profiles were observed about one hour after the start of the experiment, showing vibrations in the ternary superton regions of RNH₂ (1050nm), Ar-OH (930nm), H₂O (940nm) and R-OH (950nm), and secondary overtones relating to saturated carbon (1150nm). The components possibly present in the samples presented good relation with those reported in the literature and were also consistent comparing the values obtained between the techniques used. The results showed that the applied techniques present speed and reliability in the prediction of sample components, being able to contribute to the analysis of compounds and also assist in the health area related to clinical diagnoses.

Key words: NIR, electronic nose, PCA, *Geobacillus stearothermophilus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 Os microrganismos	13
3.2 Bactérias	14
3.2.1 A Importância das bactérias na indústria de alimentos	15
3.2.2 Bactérias produtoras de esporos	16
3.3 Processos de esterilização	18
3.4 Indicadores Biológicos	18
3.5 Espectroscopia de Infravermelho Próximo	19
3.6 Nariz Eletrônico.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Material	23
4.2 Obtenção dos esporos bacterianos	23
4.2.1 Padronização da suspensão de esporos	24
4.3 Determinação de atividade bacteriana por Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR)	25
4.4 Determinação de atividade bacteriana por Nariz Eletrônico	25
4.5 Tratamento de dados por métodos multivariados	26
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Nariz eletrônico	27
5.1.1 Alisamento de sinais.....	28
5.1.2 Aplicação do PCA nos sinais gerados pelo nariz eletrônico.....	29
5.1.3 Regressão linear a ejuste do coeficiente de determinação	30
5.2 Espectroscopia de Infravermelho Próximo	32
5.2.1 Obtenção dos espectros.....	32
5.2.2 Gráfico das variáveis	34
5.2.3 Técnica de PCA aplicada ao NIR.....	35
6. CONCLUSÃO.....	37
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38

8. REFERÊNCIAS.....	39
---------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura celular bacteriana e suas diferenciadas morfologias.....	14
Figura 2. Diferenciação dos espectros eletromagnéticos por frequência e comprimento de onda.....	19
Figura 3. Fluxograma de funcionamento de um nariz eletrônico comercial	22
Figura 4. Sinais puros gerados pelas amostras em diferentes tempos de amostragem.....	27
Figura 5. Sinais gerados após alisamento.....	28
Figura 6. Tendência no aumento do teor de compostos voláteis em relação a PC1..	29
Figura 7. Regressão linear para predição da concentração de compostos voláteis..	30
Figura 8. Ajuste do valor de coeficiente de determinação.....	30
Figura 9. Regiões distintas em amostras de suco de pêsego contaminadas e não contaminadas por <i>Alicyclobacillus</i> spp.	31
Figura 10. Espectros puros gerados a partir da leitura das amostras.....	32
Figura 11. Espectros após a realização da segunda derivada.....	33
Figura 12. Gráfico de loadings	34
Figura 13. Scores referentes a PC1.....	35

1 INTRODUÇÃO

Assim como os seres humanos, microrganismos também se utilizam de matéria orgânica para sobrevivência. Estes organismos não apresentam somente papel de deterioração, participando também de importantes processos de reciclagem de elementos químicos, como o nitrogênio. Microrganismos possuem células extremamente evoluídas, que desempenham funções de alta complexidade, mesmo quando comparadas às células de animais superiores (JAY, 2005).

Dentre estes germes, destacam-se os procariotos, seres de tamanho muito pequeno, geralmente da ordem de $1\mu\text{m}$ de diâmetro, diferenciando-se dos demais por não possuírem carioteca. Os principais procariotos são as bactérias. Estas são extremamente adaptáveis, com ampla distribuição na natureza (BROOKS, 2014).

Bactérias são vistas como seres que têm como único objetivo causar malefícios, mas na verdade essas criaturas têm íntima relação com a manutenção de todas as formas de vida conhecidas. Alguns gêneros de bactérias, como o *Azospirillum*, são responsáveis pela fixação do nitrogênio em plantas, contribuindo para seu crescimento e reprodução celular. Outros gêneros como *Acetobacter* e *Gluconobacter* são indispensáveis na indústria alimentícia para a produção de vinagre (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Algumas bactérias, como as dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus* spp. possuem a capacidade de produzir esporos. Estes são formas latentes de resistência bacteriana, compostos por várias camadas proteicas, e são formados em situações que expressam algum tipo de ameaça a esses organismos, como, por exemplo, falta de água, nutrientes ou condições ambientais adversas (DRIKS, 2002).

Alguns esporos bacterianos possuem a capacidade de resistir à temperaturas altíssimas, como é o caso do *Geobacillus stearothermophilus*. A espécie anteriormente citada costuma causar a deterioração ácida plana de alguns alimentos enlatados, conseqüentemente liberando odores, e por apresentarem grande resistência durante tratamentos térmicos são utilizados para validar processos de esterilização (WATANABE et al., 2003).

De acordo com Kalil e Costa (1994), esterilização é um processo que consiste na eliminação de todas as formas de vida presentes em determinados materiais ou alimentos, através de processos químicos ou físicos, como a utilização

de vapor seco ou úmido em altas pressão e temperatura, ou gases e radiações ionizantes, porém estes métodos demandam muito tempo e podem apresentar custos elevados.

No que se refere a descontaminação total de equipamentos e ambientes, os hospitais são os locais que apresentam maior necessidade de garantia de eficácia de processos de esterilização, pois há nesses locais grande potencial de surtos de infecção(BRITO et al., 2002).

Com intuito de garantir a eficácia de processos de esterilização indicadores biológicos são amplamente empregados. Um dos tipos de bioindicadores encontrados no mercado consiste em ampolas que contém em seu interior fitas impregnadas com esporos bacterianos, onde, caso os microrganismos se desenvolvam após o processo de esterilização evidencia-se a não eficiência dos equipamentos na remoção de possíveis patógenos dos materiais (TIPPLE et al., 2011).

Segundo Viana(2008), técnicas mais atuais não destrutivas e mais rápidas apresentam-se como uma alternativa para obtenção dos resultados desejados na caracterização de componentes amostrais, incluindo materiais que possam estar contaminados por microrganismos.Os métodos espectroscópicos mensuram a intensidade da energia gerada após a interação do analito com feixes luminosos incididos num comprimento de onda específico (BETEMPS; FACHINELLO; GALARÇA, 2011). No estudo por técnicas ópticas são utilizados diferentes equipamentos, dentre eles, o Espectrômetro de Infravermelho Próximo(NIR).Este é um equipamento que permite analisar em apenas alguns minutos uma grande gama de amostras, sem necessidade de sua destruição, e identificar moléculas e possíveis grupos funcionais. Seu funcionamento baseia-se no princípio de espectroscopia vibracional, trabalhando em comprimentos de onda que se estendem no intervalo de 750 a 2500 nm. As leituras realizadas fornecem informações sobre os constituintes químicos da amostra, através da interação das ondas eletromagnéticas emitidas pelo equipamento e o material de estudo.

Pelo fato de os microrganismos liberarem compostos voláteis e odores durante seu crescimento, outra alternativa para a sua detecção seria a utilização de um nariz eletrônico. Este é um equipamento que possui a capacidade de trabalhar em tempo real, imitando o nariz humano, detectando compostos orgânicos voláteis e

odores de diferentes substâncias, operando em conjunto com redes neurais artificiais. Os sensores do nariz eletrônico podem ser constituídos de diferentes materiais, dentre eles, polímeros condutores, oligômeros condutores, e também óxidos metálicos semicondutores (MOS) (SANTOS, 2000; UPADHYAY; SEHWAG; MISHRA, 2017).

O nariz eletrônico é um instrumento que permite a identificação de diversas substâncias dentro de uma mesma mistura, sem a necessidade de analisar os componentes individualmente. O dispositivo trabalha com softwares capazes de identificar padrões e bancos de dados referenciais (WILSON; BAIETTO, 2009).

Levando em consideração as informações anteriormente listadas, nota-se a possibilidade de utilização de métodos mais rápidos na detecção de possíveis contaminações, garantindo, desta forma, a inocuidade de alimentos, equipamentos, ferramentas e ambientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente trabalho é propor metodologias mais rápidas na detecção de forma latente bacteriana.

2.2 Objetivos específicos

- . Isolar e cultivar células germinativas de *Geobacillus stearothermophilus*(ATCC® 7953™);
- . Obter esporos de *Geobacillus stearothermophilus*(ATCC® 7953™);
- . Padronizar diferentes inóculos através das suspensões de esporos obtidas;
- . Avaliar a detecção da germinação dos esporos;
- . Analisar os dados obtidos utilizando o nariz eletrônico;
- . Analisar os dados obtidos utilizando a Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR);
- . Propor uma nova metodologia com base nos resultados obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os microrganismos

Cada um dos seres vivos existentes apresenta diferenciadas características, seja a nível de organização celular, particularidades genéticas ou fenotípicas. A fim de separar os diferentes microrganismos, foram estabelecidos parâmetros de classificação, como os reinos. No reino Monera encontram-se os procariotos (algas azuis e bactérias), no Protista estão inseridos algas, fungos limosos e protozoários (CARVALHO, 2010).

Os principais grupos de microrganismos dividem-se em protozoários, algas, fungos e bactérias. Protozoários são eucarióticos (possuem núcleo envolto por membrana) heterotróficos (necessitam da captação de nutrientes), encontrados geralmente em ambientes aquáticos, podem formar esporos e causar doenças em homens e animais. (PELCZAR JR, 1996).

Algas contém uma estrutura celular semelhante a das plantas, possuindo parede celular, realizando processos fotossintéticos e apresentando aplicações na indústria de alimentos, dando origem a espessantes e emulsificantes (PELCZAR JR, 1996).

De acordo com Madigan *et al.*, (2010) fungos englobam microrganismos com diferenciadas características morfológicas, apresentando-se como seres unicelulares ou formando estruturas filamentosas.

Fungos participam de reciclagem de compostos orgânicos e detêm aplicações de extrema importância na indústria de alimentos e farmacêutica. Segundo Abreu, Roviada, Pamphile (2015), fungos filamentosos apresentam grande interesse comercial, pois são capazes de fabricar enzimas, vitaminas, polissacarídeos, antibióticos e bebidas alcoólicas.

A distribuição dos microrganismos no planeta se dá de maneira ampla. Adaptando-se com certa facilidade ocupam lugares inabitáveis a outros seres, variando desde temperaturas extremamente altas ou congelantes até ambientes com elevadas pressões e faixas extremas de pH. A atividade metabólica exercida pelos microrganismos também é responsável pela formação e transformação dos

sedimentos do solo, contribuindo para manutenção de outras formas de vida, e síntese de combustíveis fósseis, indispensáveis à sociedade (MELO, 2008).

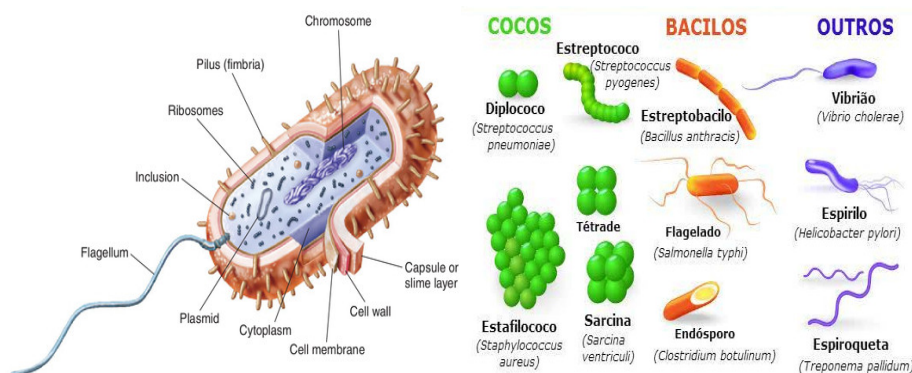
3.2 Bactérias

Bactérias são os principais representantes dos microrganismos procarióticos, apresentando um arranjo celular simplificado em relação aos microrganismos eucariontes. (BROCK; MADIGAN; MARTINKO, 2004).

Morfologicamente podem ser classificadas como cocos, bacilos, cocobacilos, vibriões, espirilos e espiroquetas. Os cocos podem organizar-se como diplococos, estreptococos, de forma téttrade, sarcina e também na forma de estafilococos. A estrutura celular bacteriana é composta basicamente por cápsula, parede celular, membrana celular, citoplasma, plasmídeo, flagelo, inclusão, ribossomos, fímbrias e cromossomos, e cada estrutura exerce diferentes funções (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Na Figura 1 podem ser observados a estrutura celular bacteriana e suas diferenciadas morfologias.

Figura 1. Estrutura celular bacteriana e suas diferenciadas morfologias



3.2.1 A Importância das bactérias na indústria de alimentos

Processos de produção de alimentos apresentam grandes possibilidades de contaminação bacteriana, antes, durante ou após processamento. A presença de alguns grupos de bacterianos pode evidenciar contaminação por material fecal, a possível contaminação por agentes patológicos e ainda expor o grau de deterioração do alimento. Esses grupos são chamados de indicadores e ajudam na identificação de alimentos impróprios ao consumo humano(GEUS; LIMA, 2008).

Segundo Felipe(2008)os diferentes microrganismos encontrados nos alimentos apresentam íntima relação com sua composição, e dependem também das condições com que estes são manipulados e armazenados.

Bactérias também são algumas das responsáveis por causar diversos tipos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), que são um grande problema para órgãos de saúde pública no mundo todo. O modo de contaminação se dá pela ingestão de produtos contaminados por toxinas ou pelas próprias bactérias, causando quadros de intoxicação ou infecção, respectivamente(WELKER et al., 2010).

Aminas biogênicas são compostos tóxicos de baixo peso molecular naturalmente encontrados em diversos alimentos de origem animal ou vegetal, no entanto, suas concentrações aumentam quando ocorre nos alimentos ação bacteriana. A elevação da concentração destes componentes pode causar quadros de intoxicação, além de serem possíveis precursores de carcinógenos (CARDOZO et al., 2013).

Doenças são identificadas como transmitidas por alimentos quando um número considerável de indivíduos apresenta mesma sintomatologia, ou quando um único indivíduo apresenta sintomas associados à patógenos de grande virulência, como nos casos de quadros causados por *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* O157:H7(OLIVEIRA et al., 2010).

Em contrapartida, bactérias também apresentam grande relevância comercial na produção de alguns tipos de alimentos. Nos processos industriais fermentativos, a acidificação causada pela ação das bactérias é essencial para conservação do produto, desfavorecendo a proliferação de microrganismos deteriorantes e também patogênicos, como constatado porVieira(2011),que inibiu o

crescimento de patógenos, pela adição de nutrientes capazes de ampliar a síntese de bacteriocina por culturas lácteas envolvidas no processo de fabricação de queijos.

3.2.2 Bactérias produtoras de esporos

De forma geral bactérias apresentam a mesma estrutura celular, os gêneros bacterianos *Clostridium sp* e *Bacillus spp* apresentam como particularidade a produção de esporos. Estes são formados em situações em que a forma vegetativa da bactéria, ou seja, sua forma ativa, encontra-se sob condições desfavoráveis. A forma esporulada protege o material genético da bactéria, que pode permanecer nesta forma durante anos, até que as condições favoráveis sejam reestabelecidas. (CARDOSO; RÜBENSAM, 2011).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem uma vasta fonte nutricional, fermentando a maioria dos açúcares e produzindo enzimas proteolíticas. Outro fator revelante em relação às bactérias do gênero anteriormente citado é a sua capacidade de degradar compostos recalcitrantes, auxiliando na redução da carga poluidora causada por resíduos provenientes de atividades industriais (PAZ, 2005).

Dentre as bactérias do gênero *Bacillus* encontram-se as bactérias termófilas, que são assim classificadas por apresentarem a necessidade de frequentar ambientes onde as temperaturas apresentam-se entre 35 e 70°C. Alguns representantes deste grupo de microrganismos já foram encontrados em ambientes de baixas temperaturas, como no caso citado por Zeigler (2014). Neste estudo o autor cita a ampla capacidade de disseminação de diferentes cepas de *Geobacillus*, possivelmente relacionada com a habilidade de adaptação dos esporos à diferentes condições ambientais.

Por ser termófilo e produtor de esporos o *Geobacillus stearothermophilus* possui a capacidade de resistir a tratamentos térmicos. Sua atividade é mais evidente na deterioração ácida plana de alimentos enlatados, havendo a possibilidade de liberação de compostos voláteis. Devido a alta resistência a

tratamentos com altas temperaturas e pressões elevadas, os esporos de *G. stearothermophilus* são amplamente utilizados na validação de processos de esterilização (PELISSARI; LIMA; LIMA, 2011; WATANABE et al., 2003; ZHOU et al., 2013).

3.3 Processos de esterilização

Por definição, a esterilização é um processo onde todas as formas de vida microbianas são eliminadas, até mesmo as resistentes formas esporuladas. Podem ser utilizados métodos envolvendo calor úmido e alta pressão, calor seco, plasma de peróxido de hidrogênio, dentre outros agentes esterilizantes (RUTALA; WEBER, 2008).

A maior fragilidade da forma vegetativa da bactéria torna sua eliminação mais simples quando comparada à forma esporulada. Dentre os fatores que mais influenciam a morte dos microrganismos estão a alta temperatura e a umidade. O alto grau de hidratação celular facilita a desnaturação proteica, causando inativação de enzimas essenciais às bactérias e maior letalidade por aumento de condutividade térmica (VENUTOLO; SOLANO, 2012).

Segundo Brito *et al.* (2002) a esterilização apresenta-se como fator de suma importância também em ambientes hospitalares, garantindo a não ocorrência de casos de infecção. Neste caso, constatou-se que artigos médico-hospitalares apresentavam-se viáveis para utilização em processos cirúrgicos por até 21 dias após realizado o processo de esterilização. Os resultados mostram que os materiais esterilizados apresentam “vida útil” mesmo após efetuado o procedimento, reforçando a importância do monitoramento de materiais já estéreis, através da utilização de indicadores biológicos.

3.4 Indicadores Biológicos

Indicadores biológicos consistem em pequenas ampolas que contém em seu interior esporos de espécies bacterianas específicas, e possuem a função de validar processos de esterilização. Outro tipo de bioindicador faz-se através da inoculação direta dos esporos em diferentes unidades amostrais de determinado material a ser esterilizado, com posterior verificação de eficácia do processo. A fim de garantir a eficiência dos processos de esterilização, normas como NBR ISO 11134 e NBR

9804 explicitam a importância de testes de cultura semanais. Cada tipo de processo exige a utilização de diferentes culturas bacterianas, como nos casos de esterilização por vapor úmido, onde são utilizadas cepas de *Bacillus stearothermophilus* (NIEHEUS, 2004).

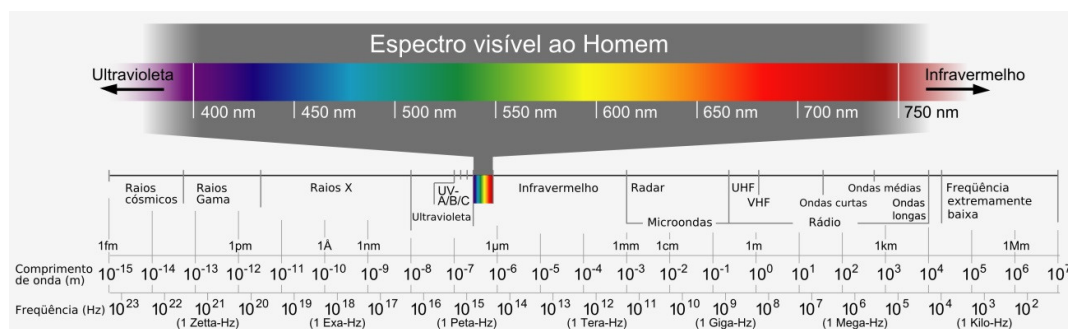
Existem, porém, algumas desvantagens na utilização de indicadores biológicos, Nieheus(2004) cita que o tempo de germinação pode demorar de 24 horas até 7 dias, podendo ocorrer problemas de amostragem, pois exigem um grande número de amostras e podem ser interpretados falsos positivos, que são ocasionados pela contaminação do veículo já esterilizado.

3.5 Espectroscopia de Infravermelho Próximo

Como citado por Francesquetti *et al.* (2013), a utilização de espectroscopia na região do infravermelho vem ganhando cada vez mais espaço entre os métodos analíticos, muito devido a vantagens como rapidez, não apresentar a necessidade de pré-tratamento das amostras e poder ser realizada com analitos em variados estados físicos.

A Figura 2 ilustra os diferentes comprimentos de onda e frequência existentes entre distintas regiões do espectro eletromagnético.

Figura 2. Diferenciação dos espectros eletromagnéticos por frequência e comprimento de onda



Na faixa que compreende a região eletromagnética do infravermelho, a radiação incidente sobre o material de estudo não possui energia suficiente para causar variações à nível eletrônico nos constituintes moleculares, alterando somente a amplitude de estados vibracionais ou rotacionais de moléculas que possuem momento dipolo (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

O uso da técnica de NIR mostrou resultados satisfatórios em relação à detecção e identificação bacteriana em estudos realizados por Saona *et al.*(2001), nos quais foi possível distinguir diferentes isolados de *Escherichia coli* com grande reprodutibilidade.

Outro trabalho realizado por Alexandrakis, Downey, Scannell(2012), evidenciou a relação entre o processo de proteólise ocorrido em peito de frango e os espectros obtidos no infravermelho próximo, o que é um indício de que a técnica poderia ser utilizada na identificação de degradação bacteriana.

3.6 Nariz Eletrônico

A constituição da matriz de sensores de um nariz eletrônico, em conjunto com softwares de reconhecimento de padrões, faz com que o dispositivo apresente um comportamento similar ao sistema olfativo de mamíferos, podendo interagir ou não, de forma seletiva com diferentes moléculas de odor (BALDWIN et al., 2011).

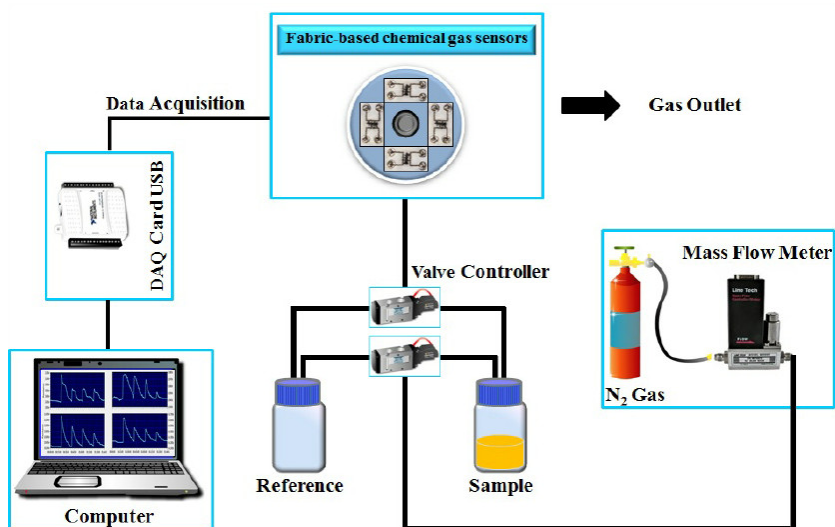
De acordo com Zouet *al.*(2015) o nariz eletrônico funciona de modo que a bomba trabalha analogamente aos pulmões, o sistema de amostragem faz o papel do muco e dos pêlos, filtrando os componentes de odor, e os sensores imitam o epitélio olfativo humano, gerando sinais elétricos similares aos impulsos nervosos que chegam aos neurônios, sendo interpretados por algoritmos de classificação de padrões.

As aplicações do nariz eletrônico são diversas, sendo utilizado para monitoramento da qualidade de ar em diferentes ambientes, determinação de parâmetros relacionados com a qualidade da água, controles de processos, e verificação de eficiência de sistemas de controle de odores. O equipamento surge como uma alternativa a ferramentas de análise já existentes, ou como complemento das mesmas, apresentando como vantagem a capacidade de avaliar e classificar diferentes odores (CAPELLI; SIRONI; ROSSO, 2014).

Uma das vantagens da utilização do nariz eletrônico na caracterização de componentes odoríferos está no baixo custo de seus constituintes. Os microcontroladores envolvidos no processo, chamados de Arduinos, possuem fácil programação e apresentam grande compatibilidade com os *softwares* e *hardwares* disponíveis no mercado (PRIMA et al., 2017).

O fluxograma de funcionamento de um nariz eletrônico comercial pode ser visto na Figura 3.

Figura 3. Fluxograma de funcionamento de um nariz eletrônico comercial



Fonte: researchgate.net

Os metabólitos liberados pelo *Geobacillus stearothermophilus* durante seu desenvolvimento são passíveis de detecção com a utilização do nariz eletrônico.

A capacidade do nariz eletrônico de captar diferentes compostos voláteis apresenta-se como uma ferramenta útil também na detecção bacteriana, como no estudo realizado por Gobbi *et al.* (2010), no qual o equipamento pôde constatar contaminação por *Alicyclobacillus spp.*, 24 horas após a inoculação do microrganismo em sucos de fruta. O dispositivo foi capaz de detectar contaminações em baixos níveis de concentração bacteriana (<10² unidades formadoras de colônias por ml).

Yusuf *et al.* (2015) confirmaram em estudo que o nariz eletrônico foi capaz de identificar e diferenciar espécies bacterianas responsáveis por causar quadros de infecção poli ou mono bacteriana, comparando os resultados obtidos com métodos clínicos tradicionais.

O uso de nariz eletrônico para testes com bactérias também mostrou resultados satisfatórios no trabalho realizado por Roine *et al.* (2014), no qual o equipamento identificou, de forma rápida, patógenos comuns associados à quadros de infecção urinária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- . Esporos de *Geobacillus stearothermophilus*
- . Mini incubadora biológica
- . Caldo Nutriente
- . Caldo Triptcaseína de Soja
- . Plate Counte Agar (PCA) suplementado com 0,1% de amido, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de sulfato de manganês, 0,05% de solução de cloreto de cálcio em pH 7
- . Tubos Roux
- . Solução de acetato de cálcio 0,02M pH 9,7
- . Solução 0,14% (p/v) de hidróxido de cálcio
- . Autoclave
- . Câmara de fluxo laminar
- . Balança analítica
- . pHmetro
- . Vortex
- . *Vials*(30mL)
- . Centrífuga para tubos *falcon* de 50mL
- . Nariz Eletrônico
- . Espectrômetro de Infravermelho Próximo (MicroNIR 1700, JDSU *Uniphase Corporation*)

4.2 Obtenção dos esporos bacterianos

A princípio, fitas comerciais *Spore Test* (Cristofoli) impregnadas com esporos de *Geobacillus stearothermophilus*(ATCC®.7953™) foram imersas em tubos

esterilizados contendo 2,5mL de caldo nutriente, nos quais permaneceram a 55°C por 24 horas.

Para o processo de esporulação foi utilizada a metodologia proposta por Penna, Machoshvili, Aquarone(1996) na qual as células vegetativas obtidas após germinação foram submetidas a choque térmico e inoculadas em tubos Roux contendo 250mL de Plate Count Agar (PCA), suplementado com 0,1% de amido, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de sulfato de manganês e 0,05% de cloreto de cálcio em pH 7, permanecendo a 55°C por um período de 12 a 15 dias, para máxima esporulação. Posteriormente, os esporos foram suspensos em solução de acetato de cálcio 0,02M em pH 9,7 ajustado com solução de hidróxido de cálcio 0,14% (p/v), seguindo para filtração em gaze e algodão esterilizados. Por fim, a suspensão foi homogeneizada com barra de agitação magnética e esferas de vidro por 30 minutos. Para limpeza da suspensão final foram realizados 4 ciclos em centrífuga a 1935g por 30 minutos, com posterior ressuspensão em solução de acetato de cálcio 0,02M com pH ajustado em 7 com solução de hidróxido de cálcio 0,14%.

A suspensão foi mantida em temperatura de refrigeração (cerca de 5°C), e utilizada conforme o necessário.

4.2.1 Padronização da suspensão de esporos

Para padronização foi realizada a contagem padrão em placas utilizando Plate Count Agar (PCA). Foram feitas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , determinando-se ao final das diluições uma concentração média de $6,105 \times 10^5$ esporos/mL, para a primeira replicata, $4,15 \times 10^5$ esporos/mL para a segunda e $7,9 \times 10^5$ esporos/mL para a terceira replicata. Com objetivo de se conseguir uma concentração similar as fitas empregadas dos indicadores biológicos ($1,5 \times 10^5$ UFM ml^{-1}) estabeleceram-se diferentes inóculos para cada uma das replicatas.

4.3 Determinação de atividade bacteriana por Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR)

Para verificação de atividade microbiana por NIR foram realizadas leituras em triplicata das amostras inoculadas (com esporos) e das amostras contendo apenas caldo triptcaseína de soja (branco), com intuito de que fossem obtidos espectros médios em cada um dos tempos de leitura: 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Este procedimento foi realizado em três dias diferentes, totalizando 60 espectros médios.

4.4 Determinação de atividade bacteriana por Nariz Eletrônico

Com intuito de realizar a limpeza do sistema de coleta e evitar a geração de sinais provenientes de ar residual, foram realizadas purgas com duração de 60 segundos antes e depois da coleta de voláteis.

A temperatura de aquisição dos voláteis foi mantida a 40°C, a fim de manter a qualidade e repetibilidade dos sinais gerados.

Para determinar a atividade microbiana por nariz eletrônico foram feitas leituras dos voláteis liberados durante o crescimento do microrganismo. *Vials* contendo apenas caldo triptcaseína de soja (branco) e *vials* contendo a solução de crescimento inoculado com esporos foram mantidos a 55°C (temperatura ótima de crescimento do microrganismo) até o equilíbrio térmico das amostras, para posterior leitura em nariz eletrônico. Os voláteis provenientes dos brancos e dos inóculos foram lidos simultaneamente nos tempos de 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos, em três dias diferentes, totalizando 60 amostras (30 brancos e 30 inóculos).

Após a obtenção dos sinais gerados pelos sensores do nariz eletrônico foi realizado o pre-tratamento dos dados, para posterior análise multivariada.

4.5 Tratamento de dados por métodos multivariados

A análise multivariada é uma forma estatística que permite a avaliação de muitas variáveis simultaneamente.

O tratamento dos dados obtidos pelos equipamentos de NIR e nariz eletrônico foi realizado através do método de Análise de Componentes Principais *Principal Component Analysis* (PCA). Este permite o estabelecimento das correlações existentes entre as variáveis experimentais, tornando possível uma significativa redução no número de variáveis sem perder as informações contidas nos dados originais (FERREIRA, 2015).

O método de PCA permite a manutenção e redistribuição das variações observadas nos eixos originais, gerando eixos ortogonais não relacionados (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2015). Inicialmente uma matriz M de dados é gerada, posteriormente são obtidos autovetores μ e autovalores τ que satisfazem a igualdade $\text{cov}(M) \mu = \tau \cdot \mu$, resultando na transformação de um espaço multidimensional em um subespaço de menor dimensão (GODINHO et al., 2008).

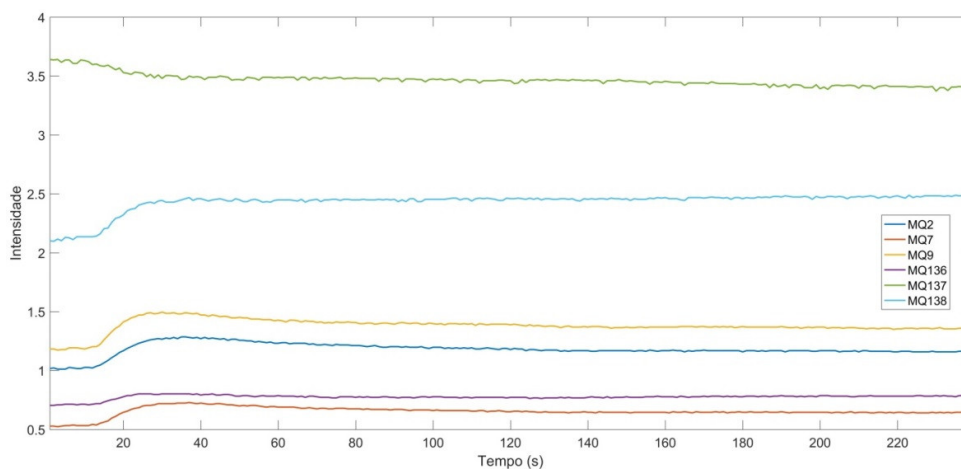
Certos experimentos possuem um relevante número de variáveis, e cada uma destas pode apresentar diferente influência sobre as variações obtidas entre os resultados experimentais. A técnica de PCA permite o reconhecimento de quais medidas apresentaram maior influência na variação entre os resultados no decorrer dos ensaios (VICINI, 2005).

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Nariz eletrônico

Os sinais gerados a partir das leituras das amostras em nariz eletrônico são apresentados na Figura 4.

Figura 4. Sinais puros gerados pelas amostras em diferentes tempos de amostragem



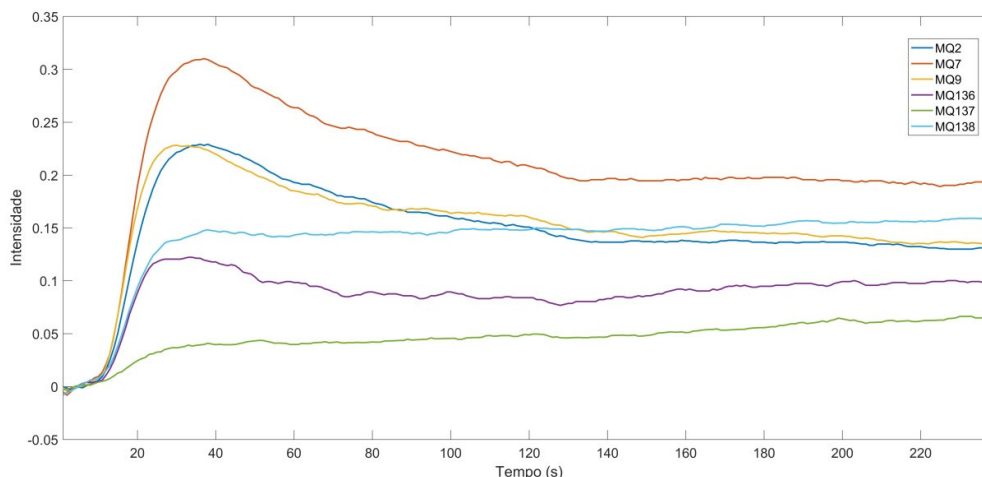
Fonte: O autor

Sensor MQ2: sensível a Gás Liquefeito de Petróleo (GLP), hidrogênio e propano. Sensor MQ7: sensível a monóxido de carbono. Sensor MQ9: sensível a monóxido de carbono, metano e propano. Sensor MQ 136: sensível a ácido sulfídrico. Sensor MQ138: sensível a acetona, etanol, formaldeído, tolueno e vapores orgânicos.

5.1.1 Alisamento de sinais

O alisamento dos sinais foi feito utilizando-se o algoritmo da média móvel, com janela de 5 pontos. Este procedimento tem como objetivo reduzir os ruídos gerados pelos componentes do sistema. Os sinais alisados podem ser observados na Figura 5.

Figura 5. Sinais gerados após alisamento



Fonte: o autor

Cada uma das seis curvas observadas na figuras 4 e 5 representam diferentes sensores com respostas a compostos voláteis específicos, variando em intensidade com o passar do tempo. Ao observar o gráfico disposto anteriormente, nota-se grande variação nos sinais gerados pelos sensores MQ2, MQ7, MQ9, MQ136 e MQ138. O sensor MQ2 possui alta sensibilidade a GLP, hidrogênio e propano, já o sensor MQ7 apresenta excitabilidade a monóxido de carbono, o sensor MQ9 mostra boas respostas frente a monóxido de carbono, metano e propano, o sensor MQ136 apresenta sensibilidade a ácido sulfídrico, e o sensor MQ138 é capaz de detectar acetona, etanol, formaldeído, tolueno e vapores orgânicos.

Os picos sugerem que a intensidade máxima dos sinais gerados ocorre cerca de 37 minutos após a inserção do inóculo no meio decrescimento, mantendo-

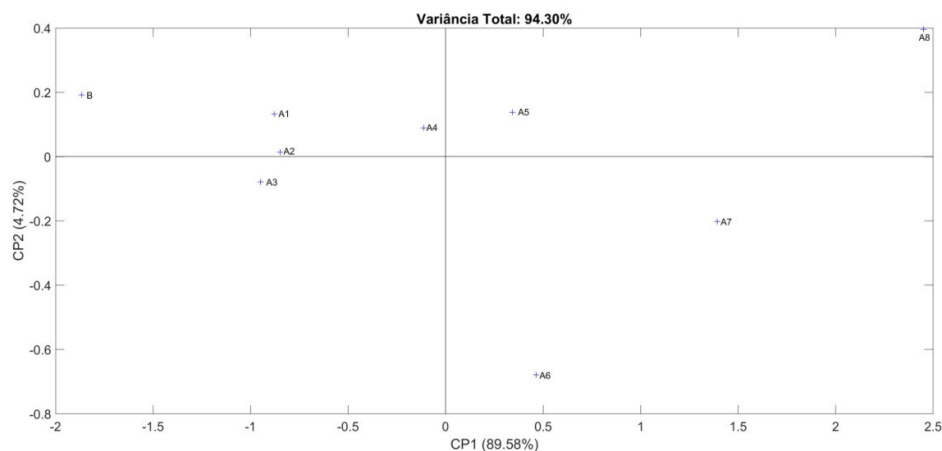
se a temperatura de 55°C. Embora os picos estejam localizados a 37 minutos do tempo inicial de aquisição de voláteis, notam-se boas variações de sinais em aproximadamente 18 minutos de leitura, evidenciando a possibilidade de identificação de contaminação bacteriana em um tempo consideravelmente mais curto.

Apesar de o *Geobacillus stearothermophilus* fermentar açúcares sem que haja a formação de gases, vários outros metabólitos como enzimas proteolíticas, enzimas que degradam ácidos nucleicos e lipídeos são produzidas durante seu desenvolvimento (PAZ, 2005). A alta temperatura de leitura das amostras pode ter contribuído para a volatilização parcial de metabólitos do meio líquido durante a captação de voláteis, indicando a possível presença de monóxido de carbono, hidrocarbonetos, alcoóis e outras moléculas gasosas.

5.1.2 Aplicação do PCA nos sinais gerados pelo nariz eletrônico

Após o alisamento dos sinais obtidos pelo nariz eletrônico foi realizado o PCA, objetivando explorar o comportamento dos dados. Nota-se na Figura 6 a tendência no aumento do teor de compostos voláteis em relação a PC1.

Figura 6. Tendência no aumento do teor de compostos voláteis em relação a PC1

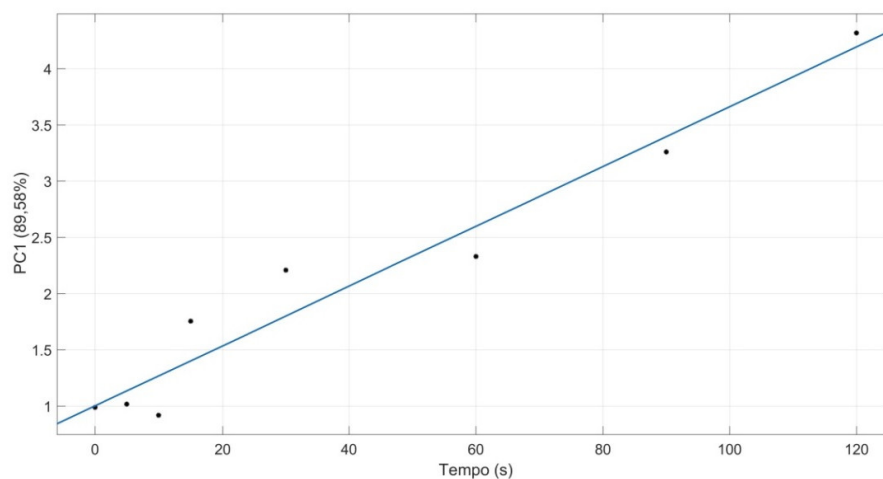


Fonte: o autor

5.1.3 Regressão linear e ajuste do coeficiente de determinação

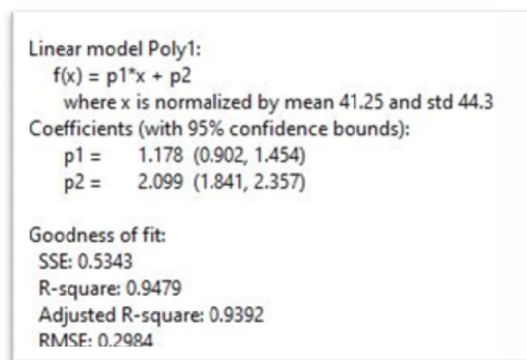
Pelo fato de aproximadamente 90% da variância experimental ter sido explicada pela PC1 foi realizada uma regressão linear em função do tempo com intuito de prever a quantidade de compostos voláteis. O ajuste apresentou valores muito satisfatórios, atingindo o valor de 0,9392 no coeficiente de determinação ajustado. A regressão linear e o ajuste podem ser observados nas Figuras 7 e 8 respectivamente.

Figura 7. Regressão linear para predição da concentração de compostos voláteis



Fonte: o autor

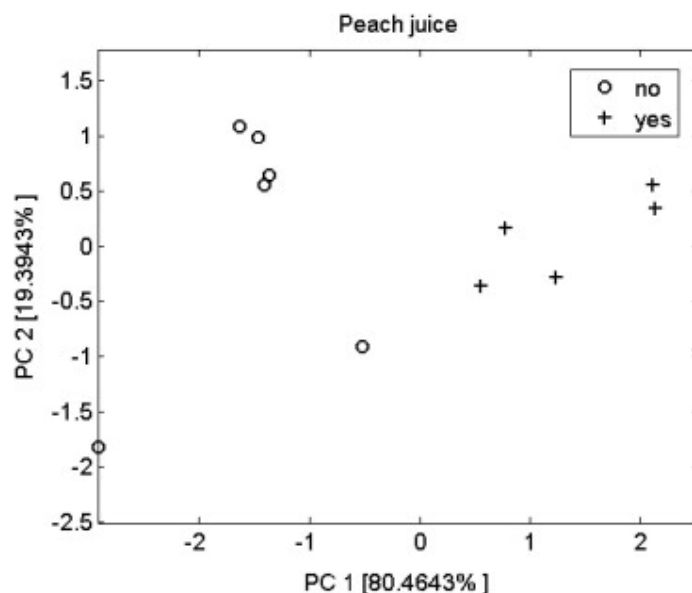
Figura 8. Ajuste do valor de coeficiente de determinação



Fonte: o autor

Conforme observado na Figura 6, nota-se que com o passar do tempo são criadas duas zonas distintas em relação a PC1. Nas primeiras leituras, A1, A2 e A3 (tempos de 0, 5 e 10 minutos após o inóculo, respectivamente) quase não há variação em relação a PC1, indicando que ainda não houve tempo suficiente para produção de compostos voláteis provenientes dos processos metabólicos do microrganismo. Em A4 uma boa variação pode ser vista ao longo do eixo principal PC1, indicando que neste momento (cerca de 15 minutos após o inóculo) já existem metabólitos em quantidades suficientemente grandes para gerar sinais no nariz eletrônico, evidenciando, desta forma, atividade bacteriana. Os pontos A5, A6, A7 e A8 estão posicionados de forma que sejam criadas duas regiões visivelmente distintas, como no trabalho desenvolvido por Gobbi *et al.*(2010). Em um dos experimentos de seu trabalho foram testadas 12 amostras de suco de pêsego, das quais 6 estavam contaminadas por *Alicyclobacillus* spp. e as outras 6 não estavam contaminadas. As leituras foram realizadas 24 horas após o incóculo bacteriano, o resultado após a realização do PCA pode ser observado na Figura 9.

Figura 9. Regiões distintas em amostras de suco de pêsego contaminadas e não contaminadas por *Alicyclobacillus* spp.



Fonte: o autor

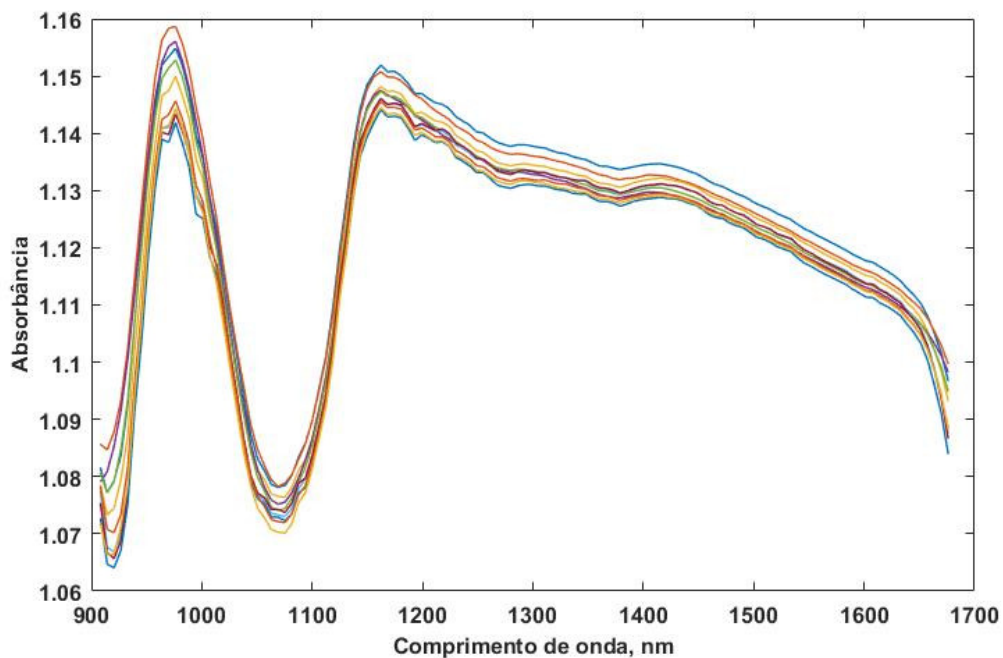
5.2 Espectroscopia de Infravermelho Próximo

5.2.1 Obtenção dos espectros

Posteriormente às etapas de inóculo e leitura, foram obtidos espectros na região do infravermelho próximo, referentes às amostras contaminadas com esporos de *Geobacillus stearothermophilus*.

Os espectros puros gerados em diferentes tempos podem ser observados na Figura 10.

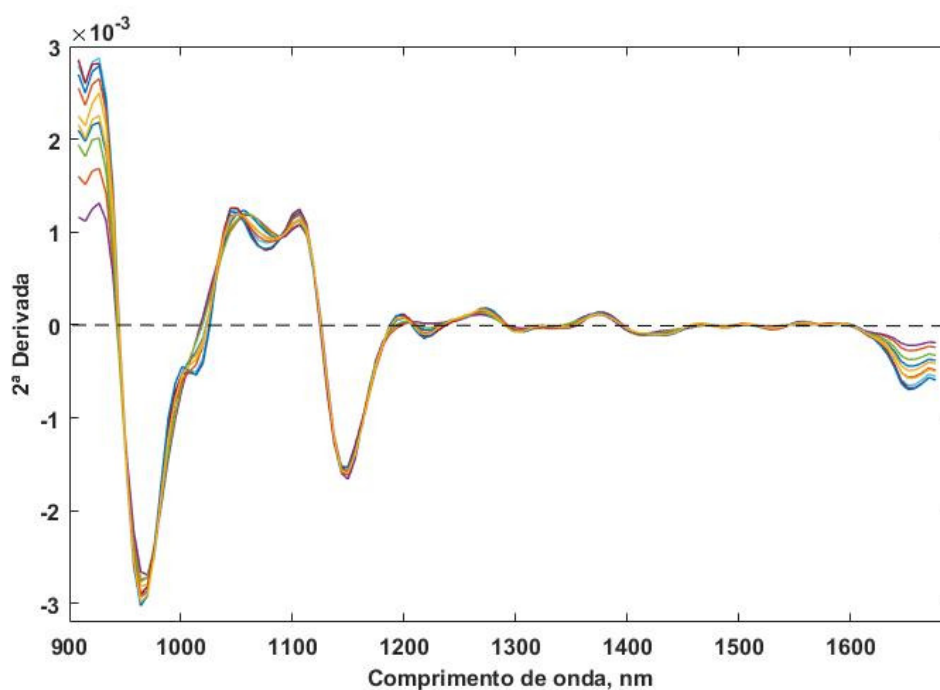
Figura 10. Espectros puros gerados a partir da leitura das amostras



Fonte: o autor

Os espectros apresentados na Figura 10 sugerem que a região de maior influência se situa entre 900 e 1200 nm. No entanto, a diferenciação das amostras a partir dos espectros se mostra como uma tarefa difícil. Com intuito de ressaltar as diferenças espectrais, usualmente faz-se operações de derivadas a fim de explicitar todas as curvaturas do espectro. Neste experimento, a operação foi segunda derivada, e o resultado está apresentado na Figura 11.

Figura 11. Espectros após a realização da segunda derivada



A aplicação de segunda derivada resalta pequenas diferenças entre os espectros gerados em diferentes tempos, sugerindo que a composição do meio realmente sofreu variações para cada um dos intervalos analisados.

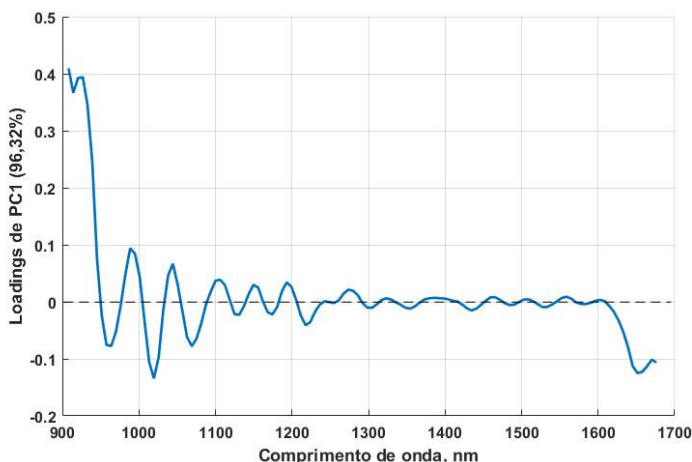
5.2.2 Gráfico das variáveis

A definição de quais regiões mais influenciam na diferenciação dos espectros ajudam a identificar quais seriam as possíveis variáveis envolvidas nas mudanças químicas das amostras. Conforme apresentado na Figura 12, sugere-se que a região compreendida entre 900 e 1200 nm é a maior responsável pela separação das amostras. No entanto, as regiões menos intensas não devem ser descartadas.

Na região compreendida entre 900 e 950 nm, são observados os maiores picos no gráfico de *loadings*. Baseando-se nos resultados obtidos por Pereira(2016) as amostras apresentaram vibrações nas regiões de sobretons terciários de RNH₂ (1050nm), Ar-OH (930nm), H₂O (940nm) e R-OH (950nm), e sobretons secundários referentes a carbono saturado (1150nm).

A detecção de possíveis grupos aminas e hidroxilas presentes pode estar relacionada com a fermentação de açúcares e proteólise causada pelo microrganismo. Já os hidrocarbonetos podem estar relacionados com os gases provenientes do aquecimento do meio de crescimento bacteriano que foi mantido próximo aos 55°C.

Figura 12. Gráfico de loadings

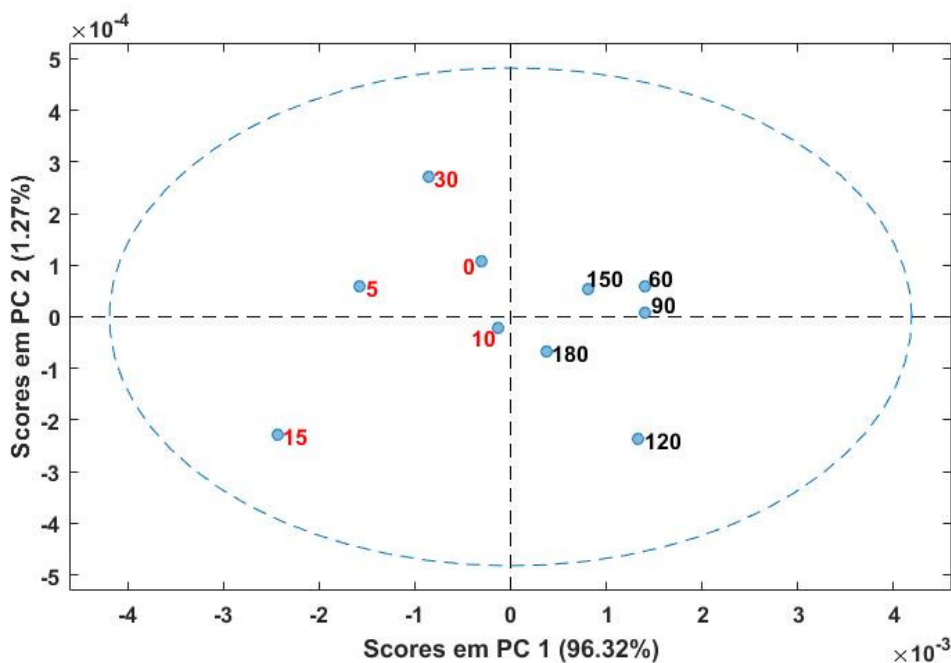


Fonte: o autor

5.2.3 Técnica de PCA aplicada ao NIR

O método de Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi aplicado aos espectros tratados por segunda derivada, e os scores estão apresentados na Figura 13. Neste caso, 2 Componentes Principais (PCs) foram suficientes para explicar 97,59% da variância total dos dados. Avaliando-se os resultados por PC1, nota-se que até o tempo de 30 minutos (quadrante negativo de PC1), as amostras não foram diferenciadas, o que significa que a técnica não foi capaz de detectar variações espectrais distinguíveis. Contudo, observando-se o quadrante positivo de PC1, observa-se que a partir de 60 minutos após o inóculo foi possível diferenciar as amostras utilizando-se a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo.

Figura 13. Scores referentes a PC1



Fonte: o autor

Os resultados mostraram-se satisfatórios se comparados ao estudo realizado por Alexandrakis, Downey, Scannell(2012), no qual diferenças significativas puderam ser observadas somente 14 dias após o início dos experimentos relacionados com o processo de deterioração ocorrido em peito de frango congelado. A temperatura e o inóculo podem ter sido responsáveis pela diferença nos tempos de detecção de atividade bacteriana, visto que os dois foram significativamente maiores nos experimentos realizados no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Tanto o Nariz Eletrônico quanto a espectroscopia NIR, em conjunto com métodos multivariados, permitiram a detecção significativamente rápida da presença de microrganismos.

O Nariz eletrônico mostrou-se eficiente na predição de compostos voláteis durante o crescimento de microrganismos termófilos, com um tempo de detecção consideravelmente menor do que as metodologias convencionais.

A técnica de NIR, apesar de demandar mais tempo em comparação ao Nariz Eletrônico também expressou resultados satisfatórios, necessitando de cerca de uma hora para detectar mudanças significativas nas amostras testadas.

As respostas obtidas pelas duas técnicas foram condizentes, uma vez que os compostos possivelmente descritos pela técnica de NIR estavam presentes segundo a matriz de sensores presentes no Nariz Eletrônico.

Sugere-se que vale a pena utilizar as tecnologias testadas na detecção bacteriana, ressaltando que mais testes são necessários para que estas técnicas possam ser oficializadas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que posteriormente o trabalho seja continuado, explorando regiões distintas do infravermelho, como por exemplo, o infravermelho médio, que permitirá não somente a diferenciação da composição do analito mas também identificar os componentes responsáveis pelas variações das respostas obtidas pelo equipamento. Pretende-se também que o estudo possa ser realizado utilizando de diferentes microrganismos e nos mais diversos alimentos e materiais.

8. REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: Aplicações Biotecnológicas. **Uningá**, v. 21, p. 55–59, 2015.
- ALEXANDRAKIS, D.; DOWNEY, G.; SCANNELL, A. G. M. Rapid Non-destructive Detection of Spoilage of Intact Chicken Breast Muscle Using Near-infrared and Fourier Transform Mid-infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. **Food Bioprocess Technol**, p. 338–347, 2012.
- BALDWIN, E. A. et al. Electronic Noses and Tongues: Applications for the Food and Pharmaceutical Industries. **Sensors**, v. 11, p. 4744–4766, 2011.
- BETEMPS, D. L.; FACHINELLO, J. C.; GALARÇA, S. P. Visible Spectroscopy and Near Infrared (Vis/Nir), in Assessing the Quality of Mangoes Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. Jaboticaba, p. 306–313, 2011.
- BRITO, M. DE F. P. et al. Validação do processo de esterilização de artigos médico-hospitalares segundo diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 55, n. 4, p. 414–419, 2002.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: 2004
- BROOKS, G. F. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- CAPELLI, L.; SIRONI, S.; ROSSO, R. DEL. Electronic Noses for Environmental Monitoring Applications. **Sensors**, v. 14, p. 19979–20007, 2014.
- CARDOZO, M.; LIMA, K.S.C.; FRANÇA, T.C.C.; LIMA, A.L.S. Aminas Biogênicas: Um Problema de Saúde Pública. *Virtual Química*, v.5, p. 149-168, 2013.
- CARVALHO, I. TEIXEIRA. **Microbiologia Básica**. Recife: 2010.
- DRIKS, A. Maximum shields: The assembly and function of the bacterial spore coat. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 251–254, 2002.
- FELIPE, L. M. **Associação de bactérias da família Enterobacteriaceae e Clostridium estertheticum com a deterioração "Blown Pack" em cortes cárneos embalados a vácuo**, p. 73, 2008.
- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria- Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: 2015.
- FRANCESQUETT, J. Z. et al. Determinação do Poder Calorífico de Amostras de Gasolina Utilizando Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Regressão Multivariada. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 88–95, 2013.
- GEUS, J. A. M. DE; LIMA, IS. A. DE. ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E

FECAIS : Um Comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. **II Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais**, n. 1997, p. 1–6, 2008.

GOBBI, E. et al. Electronic nose and Alicyclobacillus spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. **Food Control**, v. 21, p. 1374–1382, 2010.

GODINHO, M. D. S. et al. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). **Quimica Nova**, v. 31, n. 6, 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. D. O. Análise de Componentes Principais : resumo teórico , aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 1, p. 83–90, 2015.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KALIL, E. D. M.; COSTA, A. DA. Desinfecção e esterilização. **Acta Ortop Bras**, p. 1–4, 1994.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: 2010.

MELO, I. S. DE. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: 2008.

NIEHEUS, R. C. **Autoclaves verticais: uma proposta de sistema para garantiado processo de esterilização**, p. 74, 2004.

OLIVEIRA, A. B. A. DE et al. Artigo de revisão doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279–285, 2010.

PAZ, M. C. DE F. Identificação e caracterização de Bacillus licheniformes e Geobacillus stearothermophilus. Produção de biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (dbt) por uma nova amostra de Geobacillus stearothermophilus UCP 986, p. 139, 2005.

PELCZAR JR, J. M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: 1996.

PELISSARI, T. J.; LIMA, H. O. DOS S.; LIMA, M. V. DOS S. Estudo da performance do indicador biológico autocontido clean-test utilizado para validação de processo de esterilização a vapor. **REBRAPA**, v. 2, n. 1, p. 38–44, 2011.

PENNA, T. . C. V.; MACHOSHVILI, I. . A.; AQUARONE, E. Bacillus stearothermophilus spores on strips . Calibration of thermoresistance kinetics to prior biological validation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 46, p. 340–346, 1996.

PEREIRA, J. M. Metodologia alternativa para detecção rápida de Salmonella em leite via espectroscopia e quimiometria. p. 45, 2016.

PRIMA, E. C. et al. Automatic Water Tank Filling System Controlled Using Arduino™ Based Sensor for Home Application. **Procedia Engineering**, v. 170, p.

373–377, 2017.

ROINE, A. et al. Rapid and Accurate Detection of Urinary Pathogens by Mobile IMS-Based Electronic Nose : A Proof-of-Principle Study. **Plos One**, p. 1–11, 2014.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**, 2008, 2008.

SANTOS, M. S. **Construção de um Nariz Artificial usando Redes Neurais**, p.192, Universidade Federal de Pernambuco, 2000.

SAONA, L. E. R. et al. Rapid Detection and Identification of Bacterial Strains By Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 574–579, 2001.

TIPPLE, A. F. V. et al. O monitoramento de processos físicos de esterilização em hospitais do interior do estado de Goiás. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 45, n. 3, p. 751–757, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: 2008.

UPADHYAY, R.; SEHWAG, S.; MISHRA, H. N. Electronic nose guided determination of frying disposal time of sunflower oil using fuzzy logic analysis. **Food Chemistry**, v. 221, p. 379–385, 2017.

VENUTOLO, S. A.; SOLANO, O. R. Vicerrectoría de investigación y extension informe final. **Cultivo de Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953 en un biorreactor de 2 . 5 litros bajo el sistema “ batch ”**, 2012.

VIANA, L. C. **Uso da espectroscopia no infravermelho próximo para predição de propriedades tecnológicas da madeira de Eucalyptus**, p.120, Universidade Federal de Lavras, 2008.

VICINI, L. Análise multivariada da teoria à prática. p. 215, 2005.

VIEIRA, A. P. **Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de Listeria monocytogenes em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta**, p. 106, 2011.

WATANABE, T. et al. Inactivation of Geobacillus stearothermophilus Spores by High-Pressure Carbon Dioxide Treatment. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7124–7129, 2003.

WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul , Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44–48, 2010.

WILSON, A. D.; BAIETTO, M. Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications. **Sensors**, v. 9, p. 5099–5148, 2009.

YUSUF, N. et al. In-vitro diagnosis of single and poly microbial species targeted for diabetic foot infection using e-nose technology. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 158,

p. 1–12, 2015.

ZEIGLER, D. R. The Geobacillus paradox: Why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? **Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 1–11, 2014.

ZHOU, T. et al. Kinetics of Germination of Individual Spores of Geobacillus stearothermophilus as Measured by Raman Spectroscopy and Differential Interference Contrast Microscopy. **Plosone**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.

ZOU, Y. et al. Electronic Nose and Electronic Tongue. In: p. 19–44, 2015.