

Daniel Angelo Longhi

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PREDITIVA DE DIFERENTES
MODELOS MATEMÁTICOS PARA O CRESCIMENTO
MICROBIANO EM CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Borges Laurindo.

Coorientadores: Prof. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão e Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi.

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L854a Longhi, Daniel Angelo

Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas [dissertação] / Daniel Angelo Longhi ; orientador, João Borges Laurindo. - Florianópolis, SC, 2012. 116 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de alimentos. 2. Microbiologia preditiva. 3. Modelos matemáticos. 4. Lactobacilo. I. Laurindo, João Borges. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

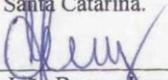
CDU 663

“Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas”

Por

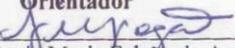
Daniel Angelo Longhi

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.



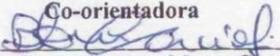
Prof. Dr. João Borges Laurindo

Orientador



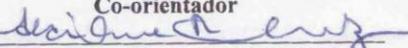
Prof.ª Dr.ª Gláucia Maria Falcão de Aragão

Co-orientadora



Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

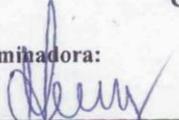
Co-orientador



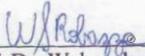
Prof.ª Dr.ª Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

Coordenadora

Banca Examinadora:



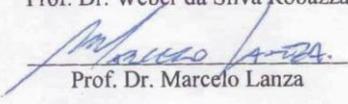
Prof. Dr. João Borges Laurindo



Prof. Dr. Weber da Silva Robazza



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior



Prof. Dr. Marcelo Lanza

Florianópolis, 21 de março de 2012.

Este trabalho é dedicado à minha mãe
Zélia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelo mundo maravilhoso;

À minha mãe Zélia, que conhece com profundidade o verdadeiro papel de mãe, por me ensinar a maneira correta de fazer as coisas, sempre com humildade e respeito a tudo e a todos, por me conceder a vida por duas vezes, e pelo amor incondicional, jamais enfraquecido pela distância;

Ao meu pai João (*in memoriam*), de quem guardo ótimas lembranças;

Aos meus irmãos João e André, por terem me ensinado a ser forte e não desistir nunca, e por me apoiarem sempre.

À minha namorada Heidy, pela dedicação, carinho, atenção, amizade, paciência e alegria; e a toda sua família, por me acolher e proporcionar momentos de alegria e descontração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João, e aos meus co-orientadores, Prof. Dra. Gláucia e Prof. Dr. Bruno, pelos ensinamentos, paciência, dedicação, incentivo e, sobretudo, exemplos de profissionalismo e competência.

Aos professores Dr. Weber da Silva Robazza, Dr. Agenor Furigo Junior e Dr. Marcelo Lanza, pela disponibilidade em participar da banca e contribuir para engrandecer este trabalho.

A todos os amigos do Laboratório PROFI e da pós-graduação, pelos momentos de estudo e descontração, dentro e fora da universidade, em especial ao Jhony, pelas contribuições a este trabalho e, sobretudo, pela grande amizade.

Aos meus amigos de longa data, José Junior, Diego, Evandro, Pandolfo e Pedro Henrique, pela amizade que não tem preço.

Aos doutores Moschetta, Geraldo, e Denizard, às equipes da Clínica Renal do Oeste, do Hospital Celso Ramos, e de transplantes do Hospital Regional do Oeste, por cuidarem de minha saúde.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma e acreditaram na realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade, à Alcilene e à Raquel, pela atenção e competência.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Investir em conhecimento rende sempre os
melhores juros.

(Benjamin Franklin)

RESUMO

Um dos principais fatores que afetam a estabilidade microbiana dos alimentos durante o armazenamento é a temperatura, cuja variação modifica a dinâmica do crescimento microbiano. O uso de modelos matemáticos que consideram variações da temperatura de armazenamento pode ser muito útil na predição da vida de prateleira de alimentos, sendo que na literatura há um grande número de modelos que podem ser usados para descrição do crescimento microbiano. Assim, o presente estudo avaliou a capacidade preditiva dos principais modelos primários e suas versões não-isotérmicas para o crescimento de *Lactobacillus plantarum* em meio MRS sob condições de temperatura variável. Dados experimentais do crescimento deste microrganismo em condições isotérmicas foram obtidos nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C, sendo usados para estabelecer os modelos primários e secundários. O crescimento de *L. plantarum* em condições não-isotérmicas foi testado para três diferentes perfis (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C) com variação de temperatura a cada 12 horas. Os valores dos índices estatísticos *RMSE*, fatores *bias* e *accuracy* indicaram que todos os modelos avaliados fornecem predições seguras do crescimento deste microrganismo nas condições não-isotérmicas testadas (fatores *bias* maior que 1). A capacidade preditiva dos modelos em descrever o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas depende muito do bom ajuste dos modelos primários e secundários. Em geral, não foi possível apontar um modelo com melhor capacidade preditiva para as condições não-isotérmicas testadas, embora o modelo Logístico modificado por Corradini e Peleg tenha apresentado melhores valores de *RMSE*, fatores *bias* e *accuracy* em relação aos outros modelos testados, enquanto o modelo de Huang apresentou predições mais distantes. Constatou-se também que a capacidade preditiva dos modelos é menor quando ocorrem variações bruscas de temperatura, especialmente para baixas temperaturas, pois os modelos não podem prever os complexos mecanismos de adaptação microbiana. Incorporar esses mecanismos nos modelos preditivos é um desafio a ser vencido.

Palavras-chave: microbiologia preditiva, modelos não-isotérmicos, *Lactobacillus plantarum*.

ABSTRACT

One of the main factors affecting the microbial stability of foods during storage is temperature, whose variation changes microbial growth dynamics. The use of mathematical models which take storage temperature variations into account can be very useful in predicting the shelf life of foods. *Lactobacillus plantarum* can be considered one of the main lactic acid bacteria and has received researcher's attention in studies on meat products. The current study assessed the predictive ability of the main primary models and their non-isothermic versions for *Lactobacillus plantarum* growth in MRS medium under variable temperature conditions. Experimental data on this microorganism's growth in isothermic conditions were obtained at 4, 8, 12, 16, 20, and 30 °C, which were used to establish the primary and secondary models. *L. plantarum* growth in non-isothermic conditions was tested for three different profiles (4-12 °C, 5-15 °C, and 20-30 °C) with the temperature varying every 12 hours. The *RMSE*, bias factor, and accuracy factor values indicate that all models assessed provide safe predictions of the growth of this microorganism at the non-isothermic conditions tested (bias factor greater than 1). The predictive capacity of the models for describing the microbial growth in non-isothermal conditions largely depends on the good fit of the primary and secondary models. Overall, it was not possible to point out a model with the best predictive ability for non-isothermic conditions, although the modified logistic model by Corradini and Peleg had the best *RMSE*, bias factor, and accuracy factor values compared to the other models assessed, while Huang's model had the worst values. It was also seen that the predictive ability of the mathematical models is lower when there are abrupt temperature variations, mainly in lower temperatures, since the models cannot predict the complex microbial adaptation mechanisms. Incorporating these mechanisms into the predictive models is a challenge yet to be overcome.

Keywords: predictive microbiology, non-isothermic models, *Lactobacillus plantarum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Curva típica do crescimento microbiano (1) e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento (2) em relação ao tempo.	31
Figura 2.2 – Comparação entre a forma convencional de obter a duração da fase <i>lag</i> definida por Pirt (1975), linha sólida, e definida por Buchanan e Cygnarowicz (1990), linha tracejada.	34
Figura 2.3 – População máxima atingida (<i>Asymptote</i>) por <i>L. plantarum</i> na faixa de temperatura entre 6 e 43 °C, e descrição dos dados com uso de um modelo secundário (–).	36
Figura 2.4 – Curvas logísticas da contagem bacteriana (<i>N</i>) e do logaritmo da contagem bacteriana ($\log N$) contra o tempo, ambas construídas com os mesmos parâmetros.	40
Figura 2.5 – Curva de crescimento típico sob condições ambientais constantes.	41
Figura 3.1 – Gráficos de comparação entre os ajustes pelos modelos puramente sigmoidais LMZ e GOM aos dados na temperatura de 12 °C (figura superior) e de resíduos dos ajustes (figura inferior).	68
Figura 3.2 – Ajuste do modelo GOM aos dados do crescimento de <i>L. plantarum</i> nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.	68
Figura 3.3 – Dados do crescimento isotérmico de <i>L. plantarum</i> a 12 °C (dados 12 °C), estimativa do crescimento isotérmico pelo modelo LCP com o uso dos modelos secundários para k e t_c (LCP 12 °C), dados do crescimento não-isotérmico do microrganismo no perfil 4-12 °C (dados 4-12 °C), predição do crescimento não-isotérmico pelo modelo LCP (LCP 4-12 °C) e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).	72
Figura 3.4 – Dados do crescimento isotérmico de <i>L. plantarum</i> a 12 °C (dados 12 °C), estimativa do crescimento isotérmico pelo modelo HUA com o uso dos modelos secundários para μ_{max} e λ (HUA 12 °C), dados do crescimento não-isotérmico do microrganismo no perfil 4-12 °C (dados 4-12 °C), predição do crescimento não-isotérmico pelo modelo HUA (HUA 4-12 °C) e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).	72
Figura 3.5 – Dados do crescimento isotérmico de <i>L. plantarum</i> a 20 °C (dados 20 °C) e a 30 °C (dados 30 °C), estimativa do crescimento isotérmico pelo modelo GOM com o uso do modelo secundário para μ_{max} (GOM 20 °C, e GOM 30 °C), dados do crescimento não-isotérmico do microrganismo no perfil de temperatura 20-30 °C (dados 20-30 °C), predição do crescimento não-isotérmico pelo modelo	

GOM (GOM 20-30 °C) e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).	74
Figura 3.6 – Dados do crescimento não-isotérmico de <i>L. plantarum</i> no perfil de temperatura 5-15 °C (dados 5-15 °C), estimativas do crescimento não-isotérmico pelo modelo LMZ com o valor do parâmetro A observado nos experimentos (LMZ A_{obs}) e com o valor de A obtido da média aritmética (LMZ A_{pdt}), e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).	74
Figura 3.7 – Dados do crescimento não-isotérmico de <i>L. plantarum</i> no perfil de temperatura 5-15 °C (dados 5-15 °C), estimativas do crescimento não-isotérmico pelo modelo BAR com o valor do parâmetro y_{max} observado nos experimentos (BAR $y_{max\ obs}$) e com o valor de y_{max} obtido da média aritmética (BAR $y_{max\ pdt}$), e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).	75
Figura 6.1 – Ajuste do modelo BAR-R aos dados do crescimento do diâmetro de <i>B. fulva</i> em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.	91
Figura 6.2 – Estimativas do parâmetro μ_{max} pelos os modelos BAR-R, FUJ-R e HUA-R para os dados do crescimento de <i>B. fulva</i> em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C, e ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados.	92
Figura 6.3 – Estimativas do parâmetro λ pelos os modelos BAR R e HUA R para os dados do crescimento de <i>B. fulva</i> em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °, e ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados.	93
Figura 6.4 – Estimativas dos parâmetros n (FUJ-R) e α (HUA-R) para os dados do crescimento de <i>B. fulva</i> em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.	93
Figura 7.1 – Curva com formato sigmoidal, típica do crescimento microbiano, contendo a representação gráfica dos parâmetros com significado biológico μ_{max} e λ , e indicação do ponto de inflexão no eixo do tempo (t_{ifx}) e do logaritmo da contagem (Y_{ifx}).	99
Figura 7.2 – Influência da variação da temperatura sobre o parâmetro empírico b e o parâmetro com significado biológico λ para o modelo GEN.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Valores médios para a população máxima atingida de algumas espécies.	36
Tabela 2.2– Valores dos parâmetros α , β e γ para diferentes modelos, conforme a Equação (2.4).	38
Tabela 2.3 – Lista de modelos matemáticos puramente sigmoidais.....	39
Tabela 2.5 – Modelos matemáticos sigmoidais com função de ajuste, baseados na Equação (2.20).	42
Tabela 2.6 – Classificação dos modelos de crescimento microbiano de acordo com a base de construção matemática e significado dos parâmetros.	43
Tabela 3.1 – Classificação, nomenclatura, abreviação e fonte dos modelos matemáticos de interesse para o presente estudo.	59
Tabela 3.2 – Equações dos modelos primários utilizados no presente estudo.	62
Tabela 3.3 – Equações diferenciais e condições iniciais utilizadas na modelagem do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas.	65
Tabela 3.4 – <i>RMSE</i> para os ajustes dos modelos aos dados de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.	67
Tabela 3.5 – Valores dos parâmetros b e T_{min} estimados pelo ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados dos parâmetros μ_{max} , k , r , λ e tc dos modelos primários, e valores de $Raj2$ e <i>RMSE</i>	69
Tabela 3.6 – Valores da média aritmética dos parâmetros A e y_{max} para cada modelo (LMZ, GOM, LCP, BAR, FKM e HUA) e a população máxima observada nos experimentos (OBS) nos três perfis de temperatura (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C).....	70
Tabela 3.7 – <i>RMSE</i> , fatores <i>bias</i> e <i>accuracy</i> para a predição do crescimento de <i>L. plantarum</i> pelos modelos nos três perfis de temperatura (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C).....	71
Tabela 3.8 – Índices estatísticos da predição do crescimento não-isotérmico de <i>L. plantarum</i> para os diferentes perfis de temperatura....	77
Tabela 6.1 – Valores de <i>RMSE</i> resultantes dos ajustes dos modelos BAR-R, FUJ-R e HUA-R aos dados do crescimento do diâmetro de colônias de <i>B. fulva</i> em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.....	91
Tabela 6.2 – Estimativas dos parâmetros dos modelos BAR-R, FKM-R e HUA-R obtidas pelos ajustes aos dados do crescimento do diâmetro de	

<i>B. fulva</i> em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.	92
Tabela 7.1 – Expressões matemáticas para o tempo no ponto de inflexão (t_{ifx}), razão logarítmica da contagem no ponto de inflexão (Y_{ifx}), velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) e duração da fase lag (λ) para os modelos Genérico (GEN) e Logístico modificado por Corradini e Peleg (LCP).....	101
Tabela 7.2 – Parâmetros estimados pelos ajustes dos modelos GEN e LCP aos dados do crescimento de <i>L. plantarum</i> a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.	101
Tabela 7.3 – Valores da velocidade específica de crescimento (μ_{max}) de <i>L. plantarum</i> a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C estimadas pelos modelos LMZ, GOM, GEN e LCP.	102
Tabela 7.4 – Valores da duração da fase lag (λ) de <i>L. plantarum</i> a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C estimadas pelos modelos LMZ, GOM, GEN e LCP.	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Elemento	Descrição
<i>Letras Latinas</i>	
<i>A</i>	Parâmetro de amplitude da curva sigmoidal
<i>a</i>	Parâmetro empírico
<i>B</i>	Função do modelo de Huang
<i>b</i>	Parâmetro empírico
<i>c</i>	Parâmetro empírico
<i>cond</i>	Condições ambientais
<i>C</i>	Parâmetro do fator de conversão
<i>d</i>	Parâmetro empírico
<i>D</i>	Função do crescimento do diâmetro de colônias de fungos
<i>F</i>	Função do modelo de Baranyi e Roberts
<i>h</i>	Função de transformação do parâmetro <i>q</i>
<i>k</i>	Parâmetro de velocidade
<i>K</i>	Parâmetro relacionado com <i>P</i>
<i>m</i>	Parâmetro empírico de curvatura
<i>n</i>	Parâmetro empírico de curvatura
<i>num</i>	Número de pontos experimentais
<i>N</i>	População microbiana
<i>ob</i>	Valor observado
<i>p</i>	Parâmetro a ser estimado nos modelos secundários
<i>pd</i>	Valor predito
<i>P</i>	Função do acúmulo de produto tóxico
<i>q</i>	Função do estado fisiológico das células
<i>Q</i>	Função logarítmica do estado fisiológico das células
<i>r</i>	Parâmetro de velocidade
<i>S</i>	Função do consumo de substrato
<i>t</i>	Tempo
<i>T</i>	Temperatura
<i>var</i>	Número de variáveis significativas
<i>y</i>	Função do logaritmo natural da população microbiana
<i>Y</i>	Função do logaritmo natural da razão entre a população microbiana e a população inicial

Letras Gregas

α	Parâmetro empírico
β	Parâmetro empírico
γ	Parâmetro empírico
λ	Parâmetro da duração da fase lag
μ	Parâmetro da velocidade específica de crescimento
Σ	Somatório
ν	Parâmetro da substância crítica ao crescimento microbiano

Subscritos e sobrescritos

0	Inicial
<i>aj</i>	Ajustado
<i>exp</i>	Fase exponencial
<i>est</i>	Fase estacionária
<i>i</i>	Contador numérico
<i>ifx</i>	Inflexão
<i>lag</i>	Fase de adaptação
<i>max</i>	Máximo
<i>min</i>	Mínimo
<i>p</i>	Produto

Operações matemáticas

$y(x)$	Valor da função y no elemento x
$a[b]$	Separador/multiplicação dos elementos a e b
$[a]^b$	Potência de b no elemento a
$\ln(x)$	Função logarítmica natural de x
$\log(x)$	Função logarítmica decimal de x
$\exp(x)$	Função exponencial de x
dx/dt	Primeira derivada de x em relação a t
d^2x/dt^2	Segunda derivada de x em relação a t

SUMÁRIO

1..... INTRODUÇÃO	27
1.1..... OBJETIVOS	28
1.1.1.. Objetivo geral.....	28
1.1.2.. Objetivos específicos	28
1.2..... DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	29
2..... REVISÃO CRÍTICA DA LITERATURA	31
2.1..... CARACTERÍSTICAS GERAIS DA MODELAGEM DE CRESCIMENTO MICROBIANO.....	31
2.1.1.. Classificação de modelos em microbiologia preditiva.....	32
2.1.2.. A fase de adaptação no crescimento microbiano (fase lag)	33
2.1.3.. A fase estacionária no crescimento microbiano.....	35
2.2..... ANÁLISE FUNDAMENTAL DA ESTRUTURA MATEMÁTICA DE MODELOS.....	37
2.2.1.. Modelos com formato puramente sigmoidal.....	38
2.2.2.. Modelos sigmoidais com função de ajuste.....	40
2.3..... APRESENTAÇÃO DE MODELOS PURAMENTE SIGMOIDAIS E SIGMOIDAIS COM FUNÇÃO DE AJUSTE UTILIZADOS EM MICROBIOLOGIA PREDITIVA	42
2.3.1.. Modelos puramente sigmoidais.....	44
2.3.1.1 Modelo Logístico e modelo Logístico modificado por Zwietering e colaboradores.....	44
2.3.1.2 Modelo de Gompertz e modelo de Gompertz modificado por Zwietering e colaboradores	45
2.3.1.3 Modelo genérico de Corradini e Peleg	45
2.3.1.4 Modelo Logístico modificado por Corradini e Peleg	46
2.3.2.. Modelos sigmoidais com função de ajuste.....	46
2.3.2.1 Modelo de Baranyi e Roberts.....	46
2.3.2.2 Modelo Produto e modelo Substrato.....	48
2.3.2.3 Modelo de Huang.....	50
2.3.2.4 Modelo de Fujikawa, Kai e Morozumi	51
2.3.2.5 Modelo de Fujikawa	51
2.4..... MODELOS SECUNDÁRIOS	52
2.5..... MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS	53
2.5.1.. Equações diferenciais baseadas nos modelos Logístico e Gompertz modificados por Zwietering e colaboradores	54
2.5.2.. Equações diferenciais baseadas nos modelos Genérico e Logístico modificado por Corradini e Peleg	54
2.5.3.. Modelo de Baranyi e Roberts.....	55
2.5.4.. Modelo de Fujikawa, Kai e Morozumi, e modelo de Fujikawa.....	56
2.5.5.. Modelo de Huang	56

3.....	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES MODELOS MATEMÁTICOS PARA A PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus plantarum</i> EM MEIO MRS EM CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS	57
3.1.....	INTRODUÇÃO.....	58
3.2.....	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3.2.1 ..	Micro-organismo e meio de cultivo	60
3.2.2 ..	Condições de crescimento	60
3.2.3 ..	Coleta de dados experimentais	61
3.2.4 ..	Modelagem matemática	61
3.2.4.1	Modelos primários	61
3.2.4.2	Modelos secundários	63
3.2.4.3	Predição do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas	64
3.2.5 ..	Análises numéricas	64
3.2.6 ..	Análises estatísticas.....	66
3.3.....	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.3.1 ..	Modelos primários.....	67
3.3.2 ..	Modelos secundários.....	69
3.3.3 ..	Predições do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas.....	70
3.3.4 ..	O efeito dos modelos secundários nas predições do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas	71
3.3.5 ..	Dificuldades de predição do comportamento microbiano em condições não-isotérmicas	75
3.4.....	CONCLUSÕES	76
3.5.....	INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	77
4	CONCLUSÕES	79
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
6	APÊNDICE A – MODELAGEM DO CRESCIMENTO DO DIÂMETRO DE COLÔNIAS DE <i>Byssochlamys fulva</i> EM SUÇO DE MAÇÃ A 25 °BRX SEM CONSIDERAR A FASE ESTACIONÁRIA	83
6.1.....	INTRODUÇÃO.....	84
6.2.....	MATERIAL E MÉTODOS.....	86
6.2.1 ..	Microrganismos e preparo da suspensão de esporos	86
6.2.2 ..	Quantificação da Suspensão de Esporos.....	86
6.2.3 ..	Meio de crescimento	87
6.2.4 ..	Avaliação do crescimento de <i>Byssochlamys fulva</i>	87
6.2.5 ..	Medida do diâmetro da colônia	88
6.2.6 ..	Modelagem matemática	88
6.2.7 ..	Análises estatísticas.....	90
6.3.....	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
6.4.....	CONCLUSÃO.....	93

7..... APÊNDICE B – Obtenção dos parâmetros com significado biológico: velocidade máxima específica de crescimento e duração da fase lag de modelos com parâmetros empíricos.....	95
7.1..... INTRODUÇÃO	96
7.2..... MATERIAL E MÉTODOS	97
7.2.1.. Micro-organismo e meio de cultivo	97
7.2.2.. Condições de crescimento.....	98
7.2.3.. Amostragem	98
7.2.4.. Modelos matemáticos.....	98
7.2.5.. Metodologia de obtenção dos parâmetros μ_{max} e λ	99
7.2.6.. Análises numéricas.....	100
7.3..... RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
7.3.1.. Obtenção dos parâmetros μ_{max} e λ para os modelos GEN e LCP ...	100
7.3.2.. Comparações entre os parâmetros biológicos dos modelos LCP, GEN, LMZ e GOM.....	101
7.4..... CONCLUSÕES	103
8..... APÊNDICE C – EQUIVALÊNCIA DE MODELOS	105
9..... REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

A segurança e a qualidade de um produto alimentício podem ser prejudicadas pela presença e proliferação de microrganismos patogênicos ou deteriorantes durante o ciclo de vida do produto, desde a matéria prima até o consumo (VAN IMPE et al., 2005). Os principais fatores que podem influenciar a estabilidade microbiana destes produtos são a temperatura, o pH e a atividade de água, sendo que a temperatura pode variar consideravelmente durante a cadeia de produção e distribuição (VAN IMPE et al., 1992). O abuso e as oscilações de temperatura podem ocorrer em qualquer ponto da cadeia de produção e distribuição de alimentos perecíveis, e também nas residências, após a compra do produto (FU; TAOUKIS; LABUZA, 1991).

A avaliação do crescimento microbiano em alimentos normalmente é relacionada com análises microbiológicas tradicionais, longos tempos de espera e elevados custos, o que sugerem o uso de métodos alternativos. Neste contexto surge a microbiologia preditiva, que trata do desenvolvimento de modelos matemáticos precisos e versáteis, aptos a descrever a evolução do crescimento microbiano em produtos alimentícios como função de condições ambientais conhecidas ou mensuráveis (VAN IMPE et al., 2005). Os modelos preditivos têm o objetivo de avaliar o efeito das operações de processamento e das condições de distribuição e armazenamento na segurança e qualidade microbiológica dos alimentos (McMEEKIN et al., 2002).

Vários autores sugerem que a origem dos modelos preditivos para alimentos seja o estudo de Esty e Meyer (1922), o qual descreve o processamento térmico suficiente para destruir esporos de *Clostridium botulinum* tipo A. A microbiologia preditiva moderna pode ser traçada a partir das décadas de 1960 e 1970, quando modelos cinéticos foram utilizados para solucionar problemas em deterioração de alimentos, seguidos do uso de modelos probabilísticos utilizados para solucionar problemas de intoxicação alimentar, particularmente botulismo e outras intoxicações (McMEEKIN; ROSS, 2002). Nas últimas décadas, a modelagem preditiva ganhou impulso com a evolução dos computadores, aumentando seu uso na avaliação do risco na cadeia de distribuição de alimentos (ZWIETERING; DEN BESTEN, 2011).

O campo da microbiologia preditiva está em constante expansão e desenvolvimento. Considerando que alimentos são sistemas reais, complexos e não seguem um mecanismo simples, a confiabilidade na aplicação de modelos sob estas condições pode ser melhorada através do

entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento microbiano (VAN IMPE; VERCAMMEM; VAN DERLINDEN, 2011).

A disponibilidade de diferentes modelos para representar o crescimento microbiano deve ser considerada para a escolha do melhor modelo para um uso específico. O uso de modelos simples que não comprometam a exatidão do ajuste é desejável (McDONALD; SUN, 1999). Eles são a base para a construção de modelos preditivos para condições ambientais dinâmicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

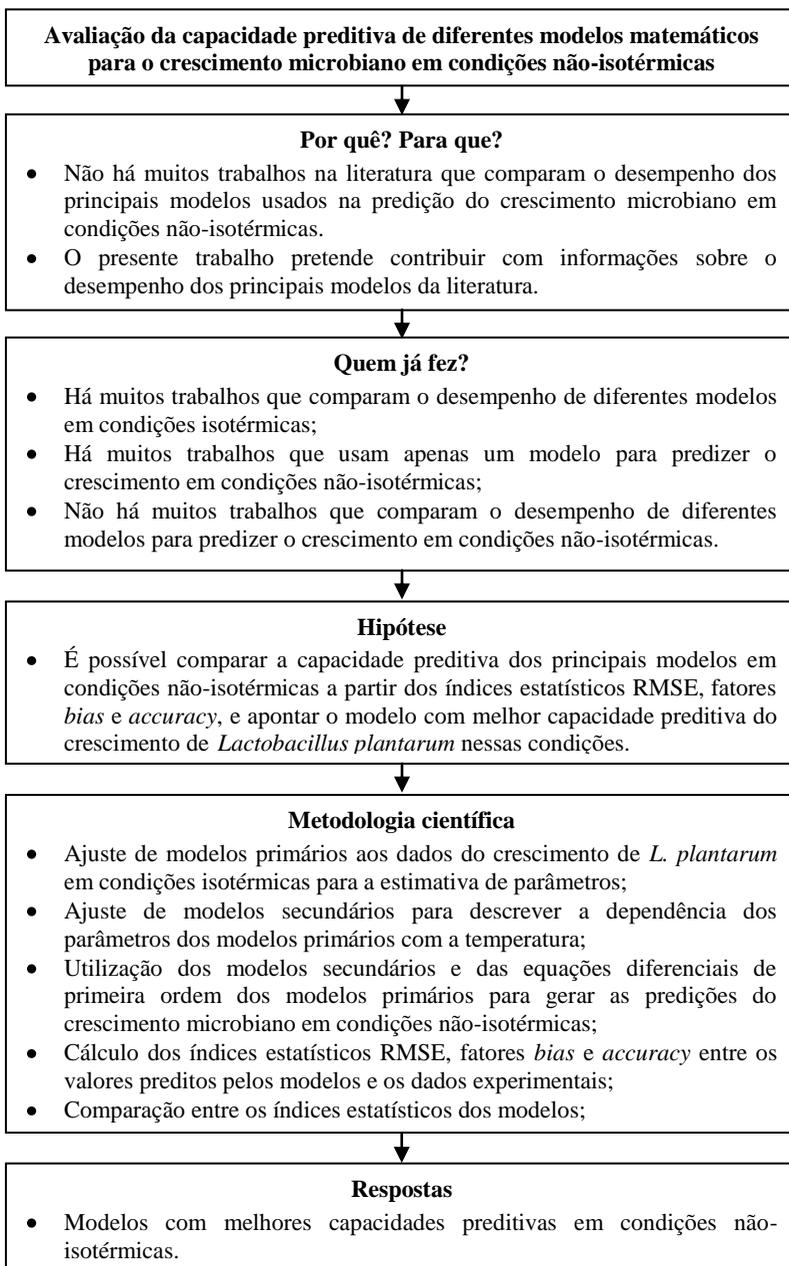
O objetivo deste trabalho foi a avaliação comparada das capacidades preditivas dos principais modelos matemáticos de crescimento microbiano em condições não-isotérmicas encontrados na literatura, com o uso de dados experimentais e indicadores estatísticos.

1.1.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, este trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- Classificação dos principais modelos de crescimento microbiano;
- Avaliação da capacidade dos modelos primários em representar os dados de crescimento da bactéria *Lactobacillus plantarum* em condições isotérmicas;
- Avaliação da capacidade preditiva dos modelos para condições não-isotérmicas: (i) Logístico modificado por Zwietering et al. (1990), (ii) Gompertz modificados por Zwietering et al. (1990), (iii) Logístico modificado por Corradini e Peleg (2005), (iv) Baranyi e Roberts (1994), (v) Fujikawa, Kai e Morozumi (2004) e (vi) Huang (2008).

1.2 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

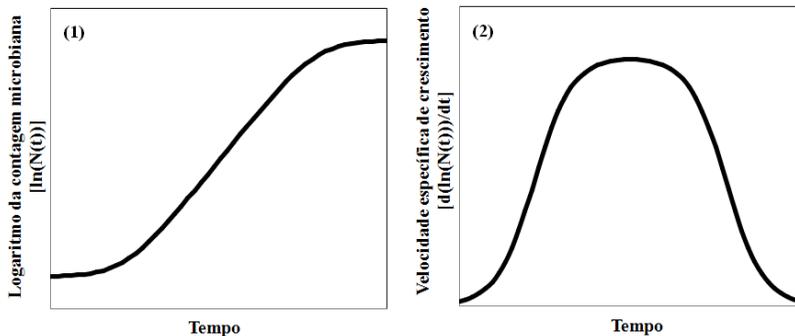


2 REVISÃO CRÍTICA DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA MODELAGEM DE CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano normalmente apresenta fases distintas. Na fase inicial, a velocidade específica do crescimento inicia em um valor próximo de zero, e então aumenta gradativamente para um valor máximo após certo tempo. Esta velocidade decresce gradativamente até se aproximar novamente de zero, quando um valor assintótico no crescimento microbiano é alcançado. Quando a curva de crescimento é apresentada através do logaritmo da contagem microbiana em função do tempo, as variações da velocidade resultam em uma curva sigmoideal (ZWIETERING et al., 1990). Na Figura 2.1 são apresentadas uma curva típica de crescimento microbiano (1) e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento (2) em relação ao tempo.

Figura 2.1 – Curva típica do crescimento microbiano (1) e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento (2) em relação ao tempo.



Um modelo matemático é uma representação simplificada da realidade, definida como o conjunto de considerações e hipóteses que irão resultar em equações matemáticas, que então podem ser programadas em uma ferramenta computacional (ZWIETERING; DEN BESTEN, 2011). O espectro de métodos e abordagens para modelagem é amplo, e é importante selecionar corretamente o tipo de modelagem para cada aplicação.

Uma grande dúvida sobre a modelagem está em considerar os complexos mecanismos que controlam um fenômeno ou fazer considerações que melhorem a parcimônia e diminuam a complexidade

das equações que representam o modelo (VAN IMPE et al., 2005). Zwietering e Den Besten (2011) ressaltam que a complexidade de um modelo nem sempre melhora sua exatidão e, além disso, pode prejudicar sua compreensão e transparência; assim, é desejável obter em um modelo o equilíbrio entre complexidade e exatidão.

A modelagem do crescimento microbiano depende da integração de habilidades da microbiologia tradicional com a matemática, estatística e sistemas de informação, sendo que este espectro de habilidades faz com que avanços em qualquer uma destas áreas promovam oportunidades potenciais para aumentar a utilidade e aplicabilidade dos modelos preditivos (McMEEKIN; MELLEFONT; ROSS, 2007).

2.1.1 Classificação de modelos em microbiologia preditiva

McDonald e Sun (1999) verificaram na literatura as diferentes formas de classificação dos modelos de microbiologia preditiva em:

- Primários, secundários e terciários,
- Cinéticos ou probabilísticos,
- Empíricos ou mecanísticos.

Foram os autores Whiting e Buchanan (1993) que propuseram a classificação dos modelos em microbiologia preditiva entre primários, secundários e terciários, em que:

Modelos primários: São modelos usados para representar a curva de crescimento microbiano com o tempo, para um único conjunto de condições ambientais constantes.

Modelos secundários: Descrevem a dependência dos parâmetros do modelo primário com relação a variáveis ambientais, como a temperatura por exemplo.

Modelos para condições ambientais variáveis: São modelos que descrevem o crescimento microbiano a partir das informações obtidas com os modelos primário e secundário(s).

Alguns desses modelos estão disponíveis em aplicativos computacionais e muitas vezes são denominados “*Modelos terciários*”. No entanto, o que a literatura da área de microbiologia preditiva denomina de “*Modelo terciário*” não é um modelo no sentido estrito. Eles são resultado do acoplamento de modelos primários e secundários para gerar sistemas que fornecem predições para não modeladores, tal como *softwares* amigáveis ao usuário. Os *softwares* podem incluir algoritmos para calcular mudanças em condições ambientais (como

variações de temperatura com o tempo de armazenamento), comparar o comportamento microbiano em diferentes condições (duas concentrações salinas, por exemplo) ou construir curvas de crescimento de mais de um microrganismo simultaneamente.

Baty e Delignette-Muller (2004) caracterizaram os modelos matemáticos de crescimento microbiano de acordo com suas estruturas matemáticas, ou seja: puramente sigmoidais, sigmoidais com função de ajuste, e segmentados.

McMeekin e Ross (2002) relatam que os modelos preditivos podem ser mecanísticos (se o modelo apresenta ou não uma base para seu desenvolvimento) ou empíricos, sendo que normalmente os modelos usados em microbiologia preditiva não são puramente mecanísticos, e alguns são simplesmente exercícios de aproximação de curvas.

Para Zwietering e Den Besten (2011) o uso de modelos para a descrição da cinética de crescimento microbiano não parte do princípio de que o mecanismo foi completamente compreendido, sendo que o desempenho aceitável do ajuste do modelo não é garantia de que seu mecanismo está correto. O desenvolvimento de modelos de crescimento microbiano totalmente mecanísticos tem sido limitado pela incapacidade de fornecer valores quantitativos para todos os parâmetros do modelo (McMEEKIN et al., 1993). A investigação de correlações entre resultados de diferentes experimentos é importante, pois desta forma princípios biológicos podem ser encontrados e mecanismos podem ser inferidos.

Para os autores Corradini e Peleg (2005), uma abordagem completamente diferente está no abandono da tentativa de encontrar um modelo de crescimento universal e confiar apenas no padrão de curvas de crescimento do organismo em questão no meio e condições ambientais em que ele foi introduzido. O formato do modelo pode ser escolhido através de considerações matemáticas convenientes, usando o princípio da parcimônia.

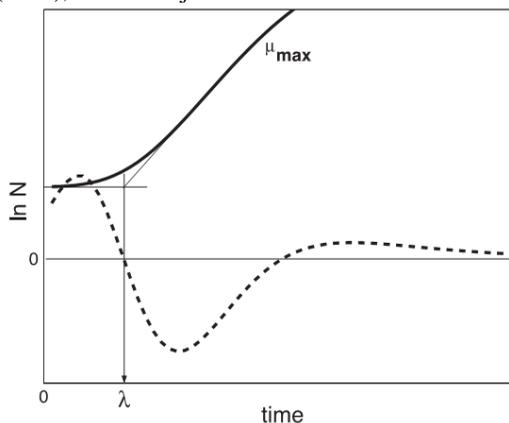
2.1.2 A fase de adaptação no crescimento microbiano (fase *lag*)

A fase *lag* é tipicamente observada como um atraso na resposta da população microbiana a uma súbita mudança no ambiente. É um período de ajuste, quando os microrganismos se adaptam a fim de obter as condições necessárias para crescer exponencialmente (SWINNEN et al., 2004). A letra grega λ é usada como o parâmetro da duração da fase *lag* nos modelos.

A duração da fase *lag* pode ser relacionada com a vida de prateleira dos alimentos, já que após o período de adaptação do microrganismo este desenvolve a capacidade de crescer exponencialmente e, em um tempo reduzido, é capaz de reduzir a estabilidade e deteriorar o alimento. Por isso, a estimativa da duração da fase *lag* tem recebido muita importância na literatura de microbiologia preditiva.

A duração da fase *lag* pode ser obtida objetivamente pela extrapolação da reta tangente da parte exponencial da curva de crescimento microbiano sigmoidal ($\ln(N(t))$ versus t) até o valor da contagem inicial (PIRT, 1975). Buchanan e Cygnarowicz (1990) propuseram que a duração da fase *lag* é definida como o tempo em que a mudança na velocidade específica de crescimento é máxima (máxima aceleração da velocidade de crescimento), isto é, o primeiro instante de tempo em que a segunda derivada do logaritmo natural do número de organismos em função do tempo é zero. A Figura 2.2 ilustra a diferença entre as duas formas de calcular a duração da fase *lag*. Zwietering, Rombouts e Vant Riet (1992) recomendam o uso da definição de Pirt, pois é a mais utilizada e facilita a comparação com os resultados da literatura.

Figura 2.2 – Comparação entre a forma convencional de obter a duração da fase *lag* definida por Pirt (1975), linha sólida, e definida por Buchanan e Cygnarowicz (1990), linha tracejada.



Fonte: Swinnen et al. (2004).

Baty e Delignette-Muller (2004) observaram que a estimativa da fase *lag* tem uma imprecisão acentuada, independentemente do modelo utilizado, e duas são as principais causas que dificultam uma estimativa segura da fase *lag*: a falta de entendimento fisiológico do fenômeno; e a definição puramente geométrica da fase *lag*.

2.1.3 A fase estacionária no crescimento microbiano

Considera-se que a fase estacionária no crescimento microbiano é alcançada depois que a população microbiana deixa de crescer exponencialmente, onde a população máxima no ambiente, sob determinadas condições, é atingida. Nesta etapa, a velocidade específica de crescimento decai para valores próximos de zero (ZWIETERING et al., 1990). A população máxima atingida no crescimento microbiano pode variar conforme o tipo de microrganismo e as condições ambientais impostas a ele.

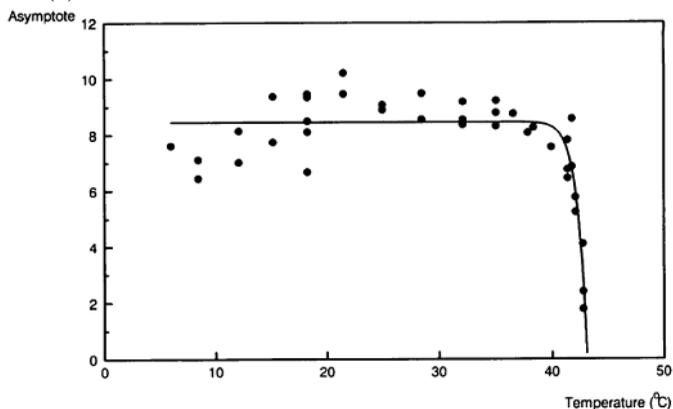
Para temperaturas próximas da ótima, o valor de máximo atingido tende a ser maior. Para temperaturas muito inferiores à temperatura ótima o valor de máximo atingido tende a ser inferior, devido ao possível efeito provocado pela temperatura na fisiologia do microrganismo.

O Apêndice A aborda a modelagem do crescimento microbiano considerando que a população máxima não é atingida, ou seja, a curva do crescimento microbiano é avaliada até a fase exponencial, desconsiderando a fase estacionária.

Zwietering et al. (1990) modelaram o crescimento de *L. plantarum* com o modelo de Gompertz modificado, na faixa de temperatura entre 6 e 43 °C. Os dados encontrados pelos autores para a população máxima atingida é apresentado na Figura 2.3. É possível observar o efeito da temperatura sobre a população máxima atingida. Os autores utilizaram um modelo secundário para modelar a dependência do parâmetro com a temperatura.

Na Tabela 2.1 estão listados alguns casos de diferentes espécies microbianas em que a população microbiana atingiu valores máximos em torno de uma média, dentro das faixas de temperatura aplicadas. Neste caso, a população máxima atingida é independente da temperatura, sendo que é possível perceber um baixo desvio padrão da média, principalmente nos casos em que as temperaturas são favoráveis ao crescimento do microrganismo.

Figura 2.3 – População máxima atingida (*Asymptote*) por *L. plantarum* na faixa de temperatura entre 6 e 43 °C, e descrição dos dados com uso de um modelo secundário (–).



Fonte: Zwietering et al. (1990).

Tabela 2.1 – Valores médios para a população máxima atingida de algumas espécies.

Microrganismo	Md ± Dp ¹ (log UFC/g)	Faixa de aplicação (°C)	Meio de Incubação	Fonte
<i>Pseudomonas</i> spp.	8,4 ± 0,7	0 - 15	Peixe do mediterrâneo	Koutsoumanis (2001)
<i>Escherichia coli</i> 1952	8,9 ± 0,1	27,6 - 36	Caldo nutriente	Fujikawa (2010)
<i>Listeria monocytogenes</i>	9,13 ± 0,09	15 - 40	Agar TSB	Huang (2008)

¹ Md representa a média das observações, e Dp o desvio padrão da média.

2.2 ANÁLISE FUNDAMENTAL DA ESTRUTURA MATEMÁTICA DE MODELOS

Os modelos matemáticos de crescimento microbiano têm sua construção baseada em um bloco elementar que descreve a evolução do crescimento da população através de uma equação diferencial de primeira ordem (BERNAERTS et al., 2004), conforme apresentado na Equação (2.1):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t, N, cond)N(t) \quad (2.1)$$

sendo que $N(t)$ é a contagem da população no instante t , e $\mu(t)$ é a velocidade específica de crescimento da população, que depende do conjunto de condições ambientais (*cond*) em que a população é submetida, além de fatores intrínsecos à própria população.

Malthus (1798) foi o primeiro autor a propor um modelo para descrever a dinâmica populacional. A construção do modelo é baseada na resolução da Equação (2.1), considerando que a velocidade específica de crescimento $\mu(t, N, cond)$ é constante (r), conforme a Equação (2.2).

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \quad (2.2)$$

Caso se considere que o ambiente onde há o crescimento da população é limitado por diversos fatores, não é possível que a população neste ambiente cresça de forma ilimitada (PELEG; CORRADINI; NORMAND, 2007; HUANG, 2008). A partir desta consideração, é necessário adicionar à Equação (2.2) um termo que represente os fatores de inibição do crescimento populacional. Verhulst (1838) adicionou um termo onde a velocidade de crescimento r decresce como uma função linear de $N(t)$, conforme apresentado na Equação (2.3):

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left[1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right] \quad (2.3)$$

sendo que N_{max} é a população máxima que o ambiente suporta.

A estrutura matemática elementar da Equação (2.3) tem sido utilizada na grande maioria dos modelos matemáticos de crescimento microbiano, com raras exceções. A partir dela, os modelos são divididos entre modelos puramente sigmoidais e modelos sigmoidais com função de ajuste.

2.2.1 Modelos com formato puramente sigmoidal

Em um artigo de revisão, Tsoularis e Wallace (2002) verificaram que uma variedade de curvas de crescimento tem sido desenvolvida ao longo da história para modelar a dinâmica populacional e o crescimento biológico, onde a maioria dos modelos tem como base a equação de crescimento de Verhulst (2.3). Os autores identificaram, então, uma forma generalizada da equação que incorpora diversos modelos como casos especiais, a qual é apresentada na equação (2.4):

$$\frac{dN(t)}{dt} = r[N(t)]^\alpha \left[1 - \left[\frac{N(t)}{N_{m\acute{a}x}} \right]^\beta \right]^\gamma \quad (2.4)$$

sendo que os parâmetros α , β e γ têm diferentes valores para cada modelo. Os modelos identificados pelos autores que apresentam o formato da Equação (2.4) são apresentados na Tabela 2.2.

A Tabela 2.3 apresenta diversos modelos matemáticos com formato puramente sigmoidal desenvolvidos ao longo da história (TSOULARIS; WALLACE, 2002), além de outros modelos encontrados na literatura.

Tabela 2.2– Valores dos parâmetros α , β e γ para diferentes modelos, conforme a Equação (2.4).

Exponential growth	$\alpha = 1$	$\beta = 1$	$\gamma = 1$
Mitscherlich or monomolecular growth	$\alpha = 0$	$\beta = 1$	$\gamma = 1$
Power growth	$\alpha > 1$		$\gamma = 0$
Generalized von Bertalanffy growth	α	$\beta = 1 - \alpha$	$\gamma = 1$
Specialized von Bertalanffy growth	$\alpha = 2/3$	$\beta = 1/3$	$\gamma = 1$
Richards growth	$\alpha = 1$	$\beta \geq -1$	$\gamma = 1$
Smith's growth	$\alpha = 0.473$	$\beta = 1$	$\gamma = 1$
Blumberg's growth	α	$\beta = 1$	γ
Hyperbolic growth	$\alpha = 1 - 1/n$	$\beta = 1$	$\gamma = 1 + 1/n$
Generic growth	$\alpha = 1 + \beta(1 - \gamma)$	β	γ
Generalized Gompertz growth	$\alpha = 1$	$\beta \rightarrow 0$	γ
Gompertz growth	$\alpha = 1$	$\beta \rightarrow 0$	$\gamma = 1$
Second order exponential polynomial	$\alpha = 1$	$\beta \rightarrow 0$	$\gamma = 1/2$

Fonte: Tsoularis e Wallace (2002).

Tabela 2.3 – Lista de modelos matemáticos puramente sigmoidais.

Modelo	Equação	
Gompertz (GOMPERTZ, 1825)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \ln \left(\frac{N_{max}}{N(t)} \right)$	(2.5)
Modelo Logístico (VERHULST, 1838)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left[1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right]$	(2.6)
von Bertalanffy (VON BERTALANFFY, 1957)	$\frac{dN(t)}{dt} = r[N(t)]^{2/3} \left[1 - \left[\frac{N(t)}{N_{max}} \right]^{1/3} \right]$	(2.7)
Richards (RICHARDS, 1959)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left[1 - \left[\frac{N(t)}{N_{max}} \right]^\beta \right]$	(2.8)
Smith (SMITH, 1963)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left[\frac{1 - N(t)/N_{max}}{1 + cN(t)/N_{max}} \right]$	(2.9)
Equação de Blumberg (BLUMBERG, 1968)	$\frac{dN(t)}{dt} = r[N(t)]^{[1-[1/n]]} \left[1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right]^{[1+[1/n]]}$	(2.10)
	$r = n \left[\frac{N_{max}}{b} \right]^{[1/n]}$	(2.11)
Modelo genérico de crescimento unificado (TURNER; BRADLEY; KIRK, 1976)	$\frac{dN(t)}{dt} = r[N(t)]^{[1+\beta(1-\gamma)]} \left[1 - \left(\frac{N(t)}{N_{max}} \right)^\beta \right]^\gamma$	(2.12)
Forma de Hossfeld's (ZEIDE, 1993)	$\frac{dN(t)}{dt} = [cb^{-[1/c]}][N(t)]^{[1-[1/c]]} \left[1 - \frac{N(t)}{a} \right]^{[1+[1/c]]}$	(2.13)
Forma de Korf's (ZEIDE, 1993)	$\frac{dN(t)}{dt} = [c[b]^{-[1/c]}]N(t)[\ln(K/a)]^{[1+[1/c]]}$	(2.14)
Modelo estruturado (HILLS; WRIGHT, 1994)	$\frac{dN(t)}{dt} = b_n[c_0 \exp(at) - N(t)]$ $dc/dt = ac$	(2.15)

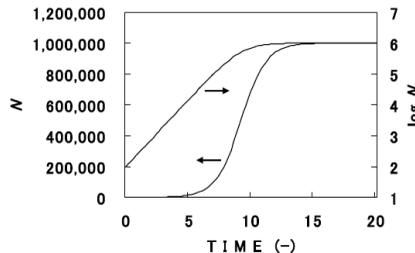
Tabela 2.3 – Lista de modelos matemáticos puramente sigmoidais.
(continuação)

Modelo	Equação
Logístico com variação da capacidade de transporte (MEYER; AUSUBEL, 1999)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left[1 - \frac{N(t)}{a(t)} \right] \quad (2.16)$ $a(t) = a_1 + \frac{a_2}{1 + \exp(-\alpha_k[t - t_a])} \quad (2.17)$
Gompertz generalizado (TSOULARIS; WALLACE, 2002)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left[\ln \left(\frac{N_{max}}{N(t)} \right) \right]^\gamma \quad (2.18)$
Logístico modificado (MESSENS et al., 2003)	$\frac{dN(t)}{dt} = \left[r \left[1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right]^n - \alpha \right] N(t) \quad (2.19)$

2.2.2 Modelos sigmoidais com função de ajuste

A curva do crescimento microbiano normalmente é expressa pelo logaritmo da contagem microbiana contra o tempo ($\ln(N(t))$ versus t) devido ao formato sigmoidal característico produzido. Entretanto, os modelos puramente sigmoidais não são capazes de descrever a curva sigmoidal completa nestas condições, pois não são capazes de descrever a fase *lag* (FUJIKAWA, 2010), como ilustrado na Figura 2.4. Isso tem incentivado o desenvolvimento de modelos com a incorporação de uma função de ajuste (VAN IMPE et al., 2005), sendo que esta função de ajuste suprime o início da curva logística, produzindo a fase *lag*.

Figura 2.4 – Curvas logísticas da contagem bacteriana (N) e do logaritmo da contagem bacteriana ($\log N$) contra o tempo, ambas construídas com os mesmos parâmetros.



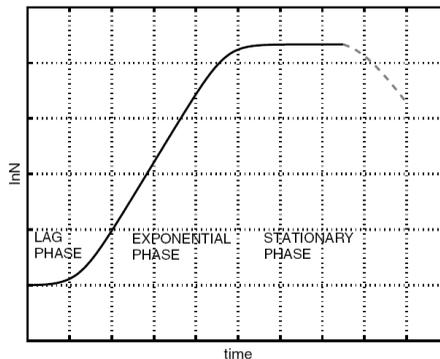
Fonte: Fujikawa (2010).

Como discutido anteriormente, se as condições ambientais são constantes, a curva de crescimento microbiano exibe o formato sigmoidal típico, contendo três fases: *lag*, exponencial e estacionária (Figura 2.5). A velocidade de crescimento global $\mu(t, N, cond)$ da Equação (2.1) pode ser representada por três fatores que descrevem as três fases de crescimento, conforme a equação (2.20) (VAN IMPE et al., 2005):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{lag}\mu_{exp}\mu_{est}N(t) \quad (2.20)$$

sendo que o fator μ_{lag} é introduzido para descrever o comportamento da fase *lag* (função de ajuste), o fator μ_{exp} é a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), e o fator μ_{est} introduz o decréscimo gradual na velocidade específica de crescimento, resultando na fase estacionária (função de inibição) (BERNAERTS et al., 2004).

Figura 2.5 – Curva de crescimento típico sob condições ambientais constantes.



Fonte: Bernaerts et al. (2004).

Os modelos matemáticos apresentados na Tabela 2.4 foram desenvolvidos para avaliar o crescimento microbiano baseado nesta estrutura.

É possível notar que alguns modelos sigmoidais com função de ajuste possuem estruturas similares, sendo que este assunto é abordado com detalhes no Apêndice C.

Tabela 2.4 – Modelos matemáticos sigmoidais com função de ajuste, baseados na Equação (2.20).

Modelo	Função de Ajuste (μ_{lag})	Fase exponencial (μ_{exp})	Função de Inibição (μ_{est})
Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994)	$\frac{q(t)}{q(t) + 1}$	μ_{max}	$1 - \frac{N(t)}{N_{max}}$
Huang (HUANG, 2008)	$\frac{1}{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])}$	μ_{max}	$1 - \frac{N(t)}{N_{max}}$
Fujikawa, Kai e Morozumi (FUJIKAWA; KAI; MOROZUMI, 2004)	$\left[1 - \frac{N_{min}}{N(t)}\right]^c$	r	$1 - \frac{N(t)}{N_{max}}$
Fujikawa (FUJIKAWA, 2010)	$1 - \left[\frac{N_{min}}{N(t)}\right]^n$	r	$1 - \left[\frac{N(t)}{N_{max}}\right]^m$

2.3 APRESENTAÇÃO DE MODELOS PURAMENTE SIGMOIDAIS E SIGMOIDAIS COM FUNÇÃO DE AJUSTE UTILIZADOS EM MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Há um grande número de modelos matemáticos para descrever o crescimento populacional (de microrganismos, por exemplo) na literatura. Vadasz e Vadasz (2005) reportam que 20 diferentes modelos estão sendo usados em microbiologia preditiva ou na área de ecologia para descrever o crescimento populacional, sendo que 14 estavam sendo usados de forma consistente na última década. Alguns destes modelos, entretanto, podem ser mais indicados para a modelagem de dados do crescimento microbiano. Segundo Corradini e Peleg (2005) a predição do crescimento microbiano não se refere ao ajuste de um modelo, ou uso bem sucedido de interpolação, mas descreve a habilidade de um modelo em estimar corretamente os resultados de experimentos inéditos, não usados para determinar seus parâmetros. Vadasz e Vadasz (2005) relatam ainda que um grande número de modelos matemáticos sejam apenas descritivos ao invés de preditivos.

Em microbiologia preditiva, muitos modelos cinéticos focam na simplicidade e aplicabilidade, com ênfase na descrição do comportamento microbiológico macroscópico em um dado ambiente. Os

modelos que não se preocupam em representar os mecanismos podem ser classificados como modelos tipo “caixa preta”.

A validação destes modelos em descrever culturas puras, em meios de crescimento simples, sob condições ambientais moderadas é largamente ilustrada e aceita (VAN IMPE; VERCAMMEN; VAN DERLINDEN, 2011), visto também que o objetivo da modelagem é fazer uma representação simplificada da realidade, e não reconstruí-la (ZWIETERING; DEN BESTEN, 2011).

A Tabela 2.5 apresenta alguns dos modelos mais utilizados na literatura de microbiologia preditiva e alguns modelos recentes, os quais foram classificados de acordo com seus formatos em modelos puramente sigmoidais, sigmoidais com função de ajuste e segmentados, baseados na classificação de Baty e Delignette-Muller (2004). Os modelos também foram divididos de acordo com os seus parâmetros, pois em microbiologia preditiva, considera-se que os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e duração da fase *lag* (λ) possuem significado biológico. Estes parâmetros são utilizados com frequência para caracterizar o crescimento de diversos microrganismos em condições ambientais específicas (ZWIETERING et al., 1994; BARANYI et al., 1995; HUANG, 2011).

Tabela 2.5 – Classificação dos modelos de crescimento microbiano de acordo com a base de construção matemática e significado dos parâmetros.

Classificação	Parâmetros			
	Com significado biológico		Empíricos	
Puramente sigmoidais	Logístico modificado por Zwietering et al. (1990)	Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990)	Logístico modificado por Corradini e Peleg (2005)	Genérico de Corradini e Peleg (2005)
			Logístico (1838)	
Sigmoidais com função de ajuste	Produto (2005)	Substrato (2005)	Fujikawa, Kai e Morozumi (2004)	Fujikawa (2010)
	Baranyi e Roberts (1994)	Huang (2008)		
Segmentados	Buchanan (1997)	Koutsoumanis (2001)		

No Apêndice B são apresentadas informações sobre a importância do significado biológico dos parâmetros em modelos de crescimento microbiano, e a obtenção destes parâmetros a partir de parâmetros empíricos.

Uma breve descrição sobre os modelos de interesse para este trabalho será apresentada a seguir, sendo que esta descrição foi extraída e adaptada dos artigos originais de suas publicações.

2.3.1 Modelos puramente sigmoidais

2.3.1.1 Modelo Logístico e modelo Logístico modificado por Zwietering e colaboradores

O modelo Logístico tem como principal característica a simetria em torno do ponto de inflexão, o que muitas vezes prejudica a eficiência de ajuste deste modelo aos dados experimentais. O modelo logístico foi inicialmente utilizado para descrever o crescimento microbiano por Gibson, Bratchell e Roberts (1987), sendo representado pela Equação (2.21):

$$y(t) = a + \frac{c}{1 + \exp(-b[t - d])} \quad (2.21)$$

sendo que $y(t)$ é o logaritmo da contagem microbiana N no tempo t , ou seja, $y(t) = \ln(N(t))$ e a , b , c e d são parâmetros empíricos do modelo.

Modelos matemáticos que possuem parâmetros com significado biológico podem ser considerados mais interessantes em termos práticos, pois a estimativa dos parâmetros de crescimento pode ser avaliada de forma mais conveniente. Modelos com menor número de parâmetros e com significado biológico são preferidos porque podem ser validados com maior facilidade pelos microbiologistas (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004). Assim, Zwietering et al. (1990) propuseram a substituição dos parâmetros empíricos a , b , c e d pelos parâmetros com significado biológico μ_{max} , λ e A , resultando na Equação (2.22):

$$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{A\mu_{max}}{A} [\lambda - t] + 1\right)} \quad (2.22)$$

sendo que $Y(t)$ é a razão logarítmica entre a contagem microbiana no tempo t e a contagem inicial, ou seja, $Y(t) = \ln(N(t)/N_0)$, μ_{max} é a

velocidade específica máxima de crescimento; λ é a duração da fase *lag*; e A é a amplitude da curva sigmoidal.

2.3.1.2 Modelo de Gompertz e modelo de Gompertz modificado por Zwietering e colaboradores

O modelo de Gompertz tem sido usado por muitos autores na modelagem preditiva do crescimento microbiano (ZWIETERING et al., 1994; PAL; LABUZA; DIEZ-GONZALEZ, 2008; SLONGO et al., 2009). Este modelo não é simétrico, o que melhora a estimativa dos seus parâmetros. O modelo de Gompertz foi inicialmente utilizado para descrever o crescimento microbiano por Gibson, Bratchell e Roberts (1987), conforme a Equação (2.23):

$$y(t) = a + c \exp(-\exp(-b[t - d])) \quad (2.23)$$

sendo que $y(t)$ é o logaritmo da contagem microbiana no tempo t ; e a , b , c e d são parâmetros empíricos do modelo.

Zwietering et al. (1990) propuseram a substituição dos parâmetros empíricos a , b , c e d pelos parâmetros com significado biológico μ_{max} , λ e A , resultando na Equação (2.24):

$$Y(t) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\exp(1) \mu_{max}}{A} [\lambda - t] + 1\right)\right) \quad (2.24)$$

sendo que $Y(t)$ é a razão logarítmica entre a contagem microbiana no tempo t e a contagem inicial, μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento; λ é a duração da fase *lag*; e A é a amplitude da curva sigmoidal.

2.3.1.3 Modelo genérico de Corradini e Peleg

Para os autores Corradini e Peleg (2005), o crescimento microbiano pode ser descrito com o uso de qualquer modelo matemático que possua o formato sigmoidal típico, com o alcance de uma fase estacionária bem definida. Além disso, outras características importantes a um modelo são simplicidade e parcimônia. Desta forma, o modelo Genérico foi proposto pelos autores, que é apresentado na Equação (2.25):

$$Y(t) = \frac{A[t]^n}{b + [t]^n} \quad (2.25)$$

sendo que A , b e n são parâmetros empíricos do modelo. O parâmetro A é a amplitude da curva sigmoideal (quando $t \rightarrow \infty$, $Y(t) \rightarrow A$) e os parâmetros n ($n > 1$) e b ($b > 1$) controlam o formato da curva.

2.3.1.4 Modelo Logístico modificado por Corradini e Peleg

Para a construção deste modelo, os autores Corradini e Peleg (2005) fizeram modificações na equação logística (2.21) de forma que as seguintes condições sejam mantidas: quando $t = 0$, $Y(t) = 0$; e quando $t \rightarrow \infty$, $Y(t) \rightarrow A$. O modelo logístico modificado pelos autores é apresentado na equação (2.26):

$$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp\left(k(t_{ifx} - t)\right)} - \frac{A}{1 + \exp(kt_{ifx})} \quad (2.26)$$

sendo que A , k e t_{ifx} são parâmetros empíricos do modelo. O parâmetro t_{ifx} faz o deslocamento da inflexão; k regula a ascensão da curva (pois é um parâmetro de velocidade), e A representa a amplitude da curva sigmoideal.

2.3.2 Modelos sigmoideais com função de ajuste

2.3.2.1 Modelo de Baranyi e Roberts

O modelo de Baranyi e Roberts é amplamente utilizado em microbiologia preditiva. Em pesquisa à base de dados *Web of Knowledge* do *ISI – Institute for Scientific Information* em 04/08/2011, foram encontradas 548 citações do artigo de revisão sobre o modelo (BARANYI; ROBERTS, 1994), 260 citações do artigo inicial do modelo (BARANYI; ROBERTS; McCLURE, 1993) e 145 citações do artigo que descreve a matemática do mecanismo (BARANYI; ROBERTS, 1995).

Para Van Impe et al. (2005) este modelo é muito usado por algumas razões: (i) é fácil de usar; (ii) é aplicável a condições com variações dinâmicas no ambiente; (iii) tem uma boa capacidade de ajuste; e (iv) a maioria dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis. O desenvolvimento do DMFit, macro do *software Excel*[®] para facilitar o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts, distribuído de forma gratuita e incluso no site *ComBase* (www.combase.cc), também contribuiu de forma significativa para a popularidade de uso deste modelo.

A função de ajuste deste modelo procura descrever o mecanismo biológico da evolução do estado fisiológico das células do microrganismo ao novo ambiente através da Equação (2.27):

$$\mu_{lag} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \quad (2.27)$$

sendo que $q(t)$ é uma função que representa a evolução de uma substância crítica ν , relacionada às reações enzimáticas envolvendo o microrganismo. A função $q(t)$ é obtida a partir da equação diferencial (2.28).

$$\frac{dq(t)}{dt} = \nu q(t) \quad (2.28)$$

sendo que ν pode ser considerada igual à velocidade específica máxima de crescimento da cultura microbiana μ_{max} , cuja razão é característica do ambiente atual.

A função de inibição pertence à família de curvas de Richards (1959), Equação (2.29), sendo que não há mecanismo biológico envolvido.

$$\mu_{est} = 1 - \left[\frac{N(t)}{N_{m\acute{a}x}} \right]^m \quad (2.29)$$

sendo que m é um parâmetro de curvatura.

Ao considerar as equações para μ_{lag} e μ_{est} , e as condições ambientais constantes, a equação diferencial (2.30) é construída.

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[\frac{q_0}{q_0 + \exp(-\mu_{max}t)} \right] \mu_{max} \left[1 - \left[\frac{N(t)}{N_{max}} \right]^m \right] N(t) \quad (2.30)$$

A equação (2.30) tem solução explícita, apresentada na Equação (2.31).

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}F(t) - \left[\frac{1}{m} \right] \ln \left(1 + \frac{\exp(m\mu_{max}F(t)) - 1}{\exp(m[y_{max} - y_0])} \right) \quad (2.31)$$

A função $F(t)$ é dada pela Equação (2.32).

$$F(t) = t + \left[\frac{1}{\mu_{max}} \right] \ln \left(\frac{q_0 + \exp(-\mu_{max}t)}{1 + q_0} \right) \quad (2.32)$$

sendo que q_0 é o estado fisiológico inicial da célula.

O parâmetro m não melhora de forma significativa a qualidade dos ajustes em muitos casos. Assim, é possível considerá-lo igual a um.

Para o ajuste do modelo aos dados experimentais, os autores aconselham a transformação do parâmetro q_0 no parâmetro h_0 através da Equação (2.33), a fim de tornar o ajuste da equação mais estável.

$$h_0 = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (2.33)$$

Desta forma, a Equação (2.32) pode ser transformada na Equação (2.34).

$$F(t) = t + \left[\frac{1}{\mu_{max}} \right] \ln(\exp(-\mu_{max}t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{max}t - h_0)) \quad (2.34)$$

Por fim, a duração da fase *lag* (λ) pode ser obtida pela Equação (2.35).

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{max}} \quad (2.35)$$

2.3.2.2 Modelo Produto e modelo Substrato

Van Impe et al. (2005) enfatizaram que os modelos Produto e Substrato têm as seguintes propriedades:

- Cinética da função de inibição que descreve a fase estacionária pode ter uma base mecanística mais apropriada;
- Capacidade de ajuste equivalente aos modelos tradicionais;
- Facilidade de aplicação em situações reais e maior complexidade.

De acordo com os autores, quando espécies isoladas crescem em um produto alimentício, o processo de auto-limitação de crescimento pode ocorrer devido à exaustão de um dos nutrientes essenciais e/ou acúmulo de produtos metabólicos residuais. Se um aumento na concentração inicial de substrato (como fontes de carbono, nitrogênio, elementos essenciais, vitaminas) resultar em um aumento da densidade populacional máxima atingida, então o fator limitante de crescimento é a disponibilidade de substrato. Se um aumento na concentração inicial de substrato não afetar a população máxima atingida, então o fator limitante é a formação de produto(s) tóxico(s). Desta forma, a construção dos modelos Produto e Substrato levam em consideração o efeito destes fenômenos.

A função de ajuste (μ_{lag}) utilizada na construção dos modelos é a equação da variação do estado fisiológico das células de Baranyi e Roberts, apresentada na Equação (2.27). Na função de inibição (μ_{est}), os autores assumem para o modelo Produto que a fase estacionária resulta

da inibição de crescimento por um produto tóxico $P(t)$, e isso implica que μ_{est} depende apenas do produto.

$$\mu_{est} = 1 - \frac{P(t)}{K_p} \quad (2.36)$$

sendo que K_p é um parâmetro relacionado com o produto.

Outras hipóteses assumidas são: (i) a concentração inicial de substância tóxica no tempo inicial é igual a zero ($P(0) = 0$); (ii) existe apenas um produto inibitório de crescimento. Assim, o modelo é composto pelas equações diferenciais (2.37), (2.38) e (2.39).

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[\frac{q(t)}{q(t) + 1} \right] \mu_{max} \left[1 - \frac{P(t)}{K_p} \right] N(t) \quad (2.37)$$

$$\frac{dq(t)}{dt} = \mu_{max} q(t) \quad (2.38)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = C_{P/N} \left[\frac{q(t)}{q(t) + 1} \right] \mu_{max} \left[1 - \frac{P(t)}{K_p} \right] N(t) \quad (2.39)$$

com as condições iniciais $N(0) = N_0$, $q(0) = q_0$ e $P(0) = 0$. A Equação (2.37) descreve a cinética do crescimento microbiano, a Equação (2.38) descreve a mudança no estado fisiológico da célula, e a Equação (2.39) descreve a produção de produtos tóxicos $P(t)$ no meio, sendo $Y_{P/N}$ um fator de conversão.

Para o modelo Substrato, os autores assumem que a fase estacionária resulta apenas da exaustão de substrato, e com isso μ_{est} depende apenas do substrato. Uma relação linear é apropriada para descrever a influência do consumo de substrato no crescimento microbiano.

$$\mu_{est} = S(t) \quad (2.40)$$

Outras hipóteses são: (i) não há consumo de substrato para manutenção; (ii) não há degradação de substrato no meio; (iii) não há adição de substrato durante o crescimento; (iv) há apenas um substrato limitante. Estas hipóteses resultam nas equações diferenciais (2.41), (2.42) e (2.43):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[\frac{q(t)}{q(t) + 1} \right] \mu_{max} S(t) N(t) \quad (2.41)$$

$$\frac{dq(t)}{dt} = \mu_{max} q(t) \quad (2.42)$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = - \left[\frac{q(t)}{q(t) + 1} \right] \mu_{max} \left[\frac{S(t)}{C_{N/S}} \right] N(t) \quad (2.43)$$

com as condições iniciais $N(0) = N_0$, $q(0) = q_0$ e $S(0) = 1$. A Equação (2.43) descreve a cinética do consumo de substrato $S(t)$. A concentração de substrato é redimensionada (fator adimensional) a fim de obter uma função de inibição decrescente, com valores entre 0 e 1.

2.3.2.3 Modelo de Huang

Para a construção do modelo, Huang (2008) assumiu que durante a fase *lag* não há modificação na contagem populacional, e que o crescimento tem início após a fase *lag*. Para descrever este comportamento, a função de ajuste μ_{lag} utilizada no modelo é uma função logística, conforme a equação (2.44):

$$\mu_{lag} = \frac{1}{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])} \quad (2.44)$$

sendo que α é um coeficiente de transição da fase *lag* para a fase exponencial. A função de inibição μ_{est} utilizada na construção do modelo é apresentada na Equação (2.3).

A equação diferencial que gera o modelo é apresentada na Equação (2.45):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[\frac{1}{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])} \right] \mu_{max} \left[1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right] \quad (2.45)$$

A Equação (2.45) pode ser resolvida analiticamente, a qual gera a Equação (2.46):

$$y(t) = y_0 + y_{max} - \ln(\exp(y_0) + [\exp(y_{max}) - \exp(y_0)] \exp(-\mu_{max}B(t))) \quad (2.46)$$

sendo que a função $B(t)$ é dada pela Equação (2.47):

$$B(t) = t + \left[\frac{1}{\alpha} \right] \ln \left(\frac{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])}{1 + \exp(\lambda\alpha)} \right) \quad (2.47)$$

O sucesso no ajuste do modelo baseia-se na escolha adequada do coeficiente de transição α . Um baixo valor de α não gera fase *lag* e exponencial, valores intermediários geram curvas similares ao modelo de Baranyi e Roberts, e para elevados valores de α , a transição entre as fases *lag* e exponencial tem forma mais definida. O ideal é obter α como parâmetro de regressão, mas para facilitar o ajuste, α pode ser declarado constante usando-se um valor apropriado. Huang indica a fixação do valor de α igual a 25.

2.3.2.4 Modelo de Fujikawa, Kai e Morozumi

Ao desenvolver o modelo, os autores Fujikawa, Kai e Morozumi (2004) utilizaram a Equação (2.3) como função de inibição (μ_{est}). Para a função de ajuste (μ_{lag}), adicionaram uma função que é análoga à função de inibição, adicionada de um termo exponencial, conforme apresentado na Equação (2.48).

$$\mu_{lag} = \left[1 - \frac{N_{min}}{N(t)}\right]^c \quad (2.48)$$

A combinação de funções gera a equação diferencial (2.49) para o modelo, a qual não possui solução analítica e, por isso, o ajuste do modelo aos dados deve ser feita de forma numérica:

$$\frac{dy(t)}{dt} = r[1 - \exp(y_{min} - y(t))]^c [1 - \exp(y(t) - y_{max})] \quad (2.49)$$

sendo que o parâmetro r é a velocidade de crescimento medida na fase exponencial da curva experimental; y_{min} é calculado através do valor de y_0 subtraído de uma parte por milhão, ou seja, $y_{min} = y_0 - 10^{-6}$; y_{max} e y_0 são obtidos por observação da curva experimental através da média aritmética; e c é um fator de ajuste ($c \geq 0$), determinado como o valor que minimiza a soma dos erros quadráticos (SSE) entre valores de crescimento observados e preditos.

2.3.2.5 Modelo de Fujikawa

Para o desenvolvimento deste modelo, Fujikawa (2010) realizou pequenas modificações em relação ao modelo de Fujikawa, Kai e Morozumi (2004), Equação (2.49). A função de inibição utilizada no modelo é adicionada de um termo exponencial m , como apresentado na Equação (2.29), e a função de ajuste tem o mesmo princípio do outro modelo, porém com o parâmetro de curvatura n envolvendo apenas a razão da população, e não a função toda, conforme apresentado na Equação (2.50).

$$\mu_{lag} = 1 - \left[\frac{N_{min}}{N(t)}\right]^n \quad (2.50)$$

Estas considerações formam a equação diferencial (2.51), que não possui solução analítica e, por isso, o ajuste do modelo aos dados deve ser feita de forma numérica:

$$\frac{dy(t)}{dt} = r[1 - \exp(n[y_{min} - y(t)])][1 - \exp(m[y(t) - y_{max}])] \quad (2.51)$$

sendo que a interpretação dos parâmetros deste modelo é análoga aos parâmetros do modelo de Fujikawa, Kai e Morozumi (2004).

2.4 MODELOS SECUNDÁRIOS

De acordo com Whiting e Buchanan (1993), modelos secundários são utilizados para descrever a variação dos parâmetros de interesse do modelo primário em função de fatores ambientais, como a temperatura, por exemplo. Qualquer equação que apresente uma boa descrição dos parâmetros do modelo primário com a temperatura pode ser usada como modelo secundário, como por exemplo, as equações logarítmica (2.52) e exponencial (2.53):

$$p = a + b \log(T) \quad (2.52)$$

$$p = a + b \exp(T) \quad (2.53)$$

sendo que a e b são parâmetros empíricos, p é o parâmetro a ser estimado, e T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Alguns modelos secundários são considerados clássicos na literatura, pois são usados em grande parte dos trabalhos na área da microbiologia preditiva. O modelo da raiz quadrada proposto por Ratkowsky et al. (1982) é um dos modelos secundários mais populares (BARANYI et al., 1995; XANTHIAKOS et al., 2006; LEE et al., 2007; GOSPAVIC et al., 2008). Este modelo descreve uma relação linear entre a raiz quadrada do parâmetro p e a temperatura, conforme apresentado na Equação (2.54):

$$\sqrt{p} = b[T - T_{min}] \quad (2.54)$$

sendo que p é o parâmetro de interesse (μ_{max} , $1/\lambda$, entre outros), b é um parâmetro empírico de inclinação ($\text{h}^{-0,5} \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$) e T_{min} é a temperatura teórica de mínimo crescimento microbiano.

Outras versões do modelo da raiz quadrada incluem modificações, tornando este modelo capaz de descrever o crescimento microbiano em diferentes condições. Sob elevadas temperaturas o crescimento microbiano pode ser interrompido devido à inativação ou desnaturação de proteínas, sendo que a adição de um termo exponencial proposto por Ratkowsky et al. (1983) habilita o modelo a descrever esta condição (VAN IMPE et al., 1992; JUNEJA et al., 2007; VELUGOTI et al., 2011), de acordo com a Equação (2.55):

$$\sqrt{p} = b[T - T_{min}][1 - \exp(c[T - T_{max}])] \quad (2.55)$$

sendo que c é um parâmetro empírico ($^{\circ}\text{C}^{-1}$), e T_{max} é a temperatura teórica de máximo crescimento microbiano ($^{\circ}\text{C}$).

Outro modelo secundário de uso popular em microbiologia preditiva é a equação do tipo Arrhenius (DAVEY, 1991; SKINNER; LARKIN; RHODEHAMEL, 1994; FUJIKAWA; KAI; MOROZUMI, 2004), de acordo com a Equação (2.56):

$$p = a \exp\left(-\frac{b}{T}\right) \quad (2.56)$$

sendo que a ($\text{h}^{-0.5} \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$) e b ($^{\circ}\text{C}$) são parâmetros empíricos do modelo.

2.5 MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS

Durante a cadeia de produção e distribuição de alimentos perecíveis, a temperatura é um fator que pode variar consideravelmente, sendo que a exposição a diferentes temperaturas pode ocorrer e comprometer a qualidade do produto (FU; LABUZA, 1992; VAN IMPE et al., 1992). Como a capacidade descritiva de modelos primários pode ser garantida apenas para condições ambientais constantes, é necessário o uso de outras abordagens para prever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas.

Para a modelagem do crescimento microbiano em condições ambientais variáveis os modelos são utilizados como equações diferenciais de primeira ordem, sendo que os parâmetros destas equações tornam-se funções das variações ambientais, dadas por modelos secundários apropriados. Assim, o modelo leva em consideração a variação dos fatores ambientais com o tempo, e torna-se equivalente ao modelo primário quando as condições ambientais aplicadas forem constantes. Esta abordagem de modelagem foi proposta inicialmente por Van Impe et al. (1992), sendo que é a base do desenvolvimento dos modelos de crescimento com variações ambientais.

Quando a temperatura é o fator ambiental que tem maior influência no crescimento microbiano, outros fatores (como pH ou a_w) podem ser considerados constantes. A modelagem do crescimento microbiano é avaliada para condições não-isotérmicas, e desta forma os parâmetros do modelo tornam-se função exclusivamente da temperatura, sendo que o perfil da variação da temperatura com o tempo $T(t)$ deve ser descrito através de funções apropriadas.

2.5.1 Equações diferenciais baseadas nos modelos Logístico e Gompertz modificados por Zwietering e colaboradores

Os modelos Logístico e Gompertz modificados por Zwietering e colaboradores são originalmente capazes de descrever o crescimento microbiano apenas para condições isotérmicas. As equações diferenciais de primeira ordem para descrever o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas foram propostas por Van Impe et al. (1992). A Equação (2.57) é baseada no modelo de Gompertz modificado por Zwietering e colaboradores, e a Equação (2.58) é baseada no modelo Logístico modificado por Zwietering e colaboradores, as quais são utilizadas para prever o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas:

$$\frac{dY(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{\exp(1)}{A} \right] \ln \left(\frac{A}{Y(t)} \right) Y(t) \quad (2.57)$$

$$\frac{dY(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{A}{A} \right] \left[1 - \frac{Y(t)}{A} \right] Y(t) \quad (2.58)$$

sendo que $Y(t)$ é a razão logarítmica entre a contagem microbiana no tempo t e a contagem inicial ($Y(t) = \ln(N/N_0)$), e os parâmetros μ_{max} e A são funções da temperatura, descritos por modelos secundários.

As condições iniciais para resolução das equações diferenciais (2.57) e (2.58) são apresentadas nas Equações (2.59) e (2.60), respectivamente:

$$Y(0) = \frac{A}{1 + \exp \left(\frac{4\lambda\mu_{max}}{A} + 2 \right)} \quad (2.59)$$

$$Y(0) = A \exp \left(- \exp \left(\frac{\lambda\mu_{max} \exp(1)}{A} + 1 \right) \right) \quad (2.60)$$

sendo que os parâmetros μ_{max} , λ e A correspondem aos valores destes parâmetros na temperatura de incubação.

2.5.2 Equações diferenciais baseadas nos modelos Genérico e Logístico modificado por Corradini e Peleg

As equações diferenciais (2.61) e (2.62) correspondem aos modelos Genérico e Logístico modificado por Corradini e Peleg:

$$\frac{dY(t)}{dt} = \frac{Abn[t^{*[n-1]}]}{(b + t^{*[n]})^2} \quad (2.61)$$

$$\frac{dY(t)}{dt} = \frac{kA \exp(k[t_{ifx} - t^*])}{[1 + \exp(k[t_{ifx} - t^*])]^2} \quad (2.62)$$

sendo que os parâmetros A , b , n , k e t_{ifx} são funções da temperatura, descritos por modelos secundários; e t^* é o tempo que corresponde a qualquer nível de crescimento isotérmico, o qual é obtido isolando-se t dos modelos primários. As expressões matemáticas de t^* para os modelos Genérico e Logístico modificado por Corradini e Peleg são apresentadas nas Equações (2.63) e (2.64), respectivamente.

$$t^* = \left[\frac{bY(t)}{a - Y(t)} \right]^{[1/n]} \quad (2.63)$$

$$t^* = \left[\frac{1}{k} \right] \ln \left(\frac{\exp(kt_{ifx}) [A + Y(t) [1 + \exp(kt_{ifx})]]}{A \exp(kt_{ifx}) - Y(t) [1 + \exp(kt_{ifx})]} \right) \quad (2.64)$$

A condição inicial para resolução das equações diferenciais (2.61) e (2.62) é apresentada na Equação (2.65).

$$Y(0) = 0 \quad (2.65)$$

2.5.3 Modelo de Baranyi e Roberts

As equações diferenciais (2.66) e (2.67) compõem o modelo de Baranyi e Roberts, as quais são utilizadas para a predição do crescimento microbiano em condições ambientais não-isotérmicas:

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] [1 - \exp(y(t) - y_{max})] \quad (2.66)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{max} \quad (2.67)$$

sendo que $y(t)$ é o logaritmo natural da contagem microbiana no tempo t , ou seja, $y(t) = \ln(N(t))$; $Q(t)$ é a função logarítmica do estado fisiológico das células ($Q(t) = \ln(q(t))$); e os parâmetros μ_{max} e y_{max} são funções da temperatura, descritos por modelos secundários.

As condições iniciais para resolução das equações diferenciais (2.66) e (2.67) são apresentadas nas Equações (2.68) e (2.69), respectivamente:

$$y(0) = y_0 \quad (2.68)$$

$$Q(0) = Q_0 \quad (2.69)$$

sendo que y_0 é o valor do logaritmo natural da contagem bacteriana inicial, ou seja, $y(0) = \ln(N_0)$, e Q_0 é o valor logarítmico do estado fisiológico inicial das células, sendo que Q_0 se relaciona com o parâmetro h_0 através da Equação (2.70).

$$Q_0 = -\ln(\exp(h_0) - 1) \quad (2.70)$$

2.5.4 Modelo de Fujikawa, Kai e Morozumi, e modelo de Fujikawa

As equações diferenciais (2.71) e (2.72) correspondem ao modelo de Fujikawa, Kai e Morozumi, e ao modelo de Fujikawa, respectivamente:

$$\frac{dy(t)}{dt} = r[1 - \exp(y_{min} - y(t))]^c [1 - \exp(y(t) - y_{max})] \quad (2.71)$$

$$\frac{dy(t)}{dt} = r[1 - \exp(n[y_{min} - y(t)])][1 - \exp(m[y(t) - y_{max}])] \quad (2.72)$$

sendo que os parâmetros r e y_{max} são funções da temperatura, descritos por modelos secundários; o parâmetro c é o valor da média deste parâmetro na condição isotérmica; e y_{min} é logaritmo da contagem microbiana inicial subtraída de uma parte por milhão.

A condição inicial para resolução das equações diferenciais (2.71) e (2.72) é comum a todos os modelos sigmoidais com função de ajuste, apresentada na Equação (2.68).

2.5.5 Modelo de Huang

A equação diferencial (2.73) corresponde ao modelo de Huang:

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{1}{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])} \right] [1 - \exp(y(t) - y_{max})] \quad (2.73)$$

sendo que os parâmetros α , λ , μ_{max} e y_{max} são funções da temperatura, descritos por modelos secundários. A condição inicial para resolução da equação diferencial (2.73) é apresentada na Equação (2.68).

3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES MODELOS MATEMÁTICOS PARA A PREDIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus plantarum* EM MEIO MRS EM CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS

O laboratório de Engenharia Bioquímica (Engebio) da Universidade Federal de Santa Catarina forneceu as informações do crescimento de *L. plantarum* em meio MRS, sendo que estes dados foram obtidos durante o desenvolvimento da tese de doutorado de Francieli Dalcanton. A metodologia experimental e os resultados do crescimento de *L. plantarum* nas condições isotérmicas e não-isotérmicas utilizadas neste trabalho podem ser verificados na tese “Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não-isotérmicas” (DALCANTON, 2010).

RESUMO

Um dos principais fatores que afetam a estabilidade microbiana dos alimentos durante o armazenamento é a temperatura, cuja variação modifica a dinâmica do crescimento microbiano. O uso de modelos matemáticos que consideram variações da temperatura de armazenamento pode ser muito útil na predição da vida de prateleira de alimentos. *Lactobacillus plantarum* pode ser considerada uma das principais bactérias ácido lácticas, tendo recebido atenção de pesquisadores em estudos envolvendo produtos cárneos. O presente estudo avaliou a capacidade preditiva dos principais modelos primários e suas versões não-isotérmicas para o crescimento de *L. plantarum* em meio MRS sob condições de temperatura variável. Dados experimentais do crescimento deste microrganismo em condições isotérmicas foram obtidos nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C, sendo usados para estabelecer os modelos primários e secundários. O crescimento de *L. plantarum* em condições não-isotérmicas foi testado para três diferentes perfis (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C) com variação de temperatura a cada 12 horas. Os valores de *RMSE*, fatores *bias* e *accuracy* indicaram que todos os modelos avaliados fornecem predições seguras do crescimento deste microrganismo nas condições não-isotérmicas testadas (fatores *bias* maior que 1). A capacidade preditiva dos modelos em descrever o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas depende muito do bom ajuste dos modelos primários e secundários. Em geral, não foi possível apontar um modelo com melhor capacidade preditiva para condições não-isotérmicas,

embora o modelo Logístico modificado por Corradini e Peleg tenha apresentado melhores valores de *RMSE*, fatores *bias* e *accuracy* em relação aos outros modelos testados, e o modelo de Huang piores valores. Constatou-se também que a capacidade preditiva dos modelos matemáticos é menor quando ocorrem variações bruscas de temperatura, especialmente para baixas temperaturas, pois os modelos não podem prever os complexos mecanismos de adaptação microbiana. Incorporar esses mecanismos nos modelos preditivos é um desafio a ser vencido.

Palavras-chave: microbiologia preditiva, modelos não-isotérmicos, *Lactobacillus plantarum*.

3.1 INTRODUÇÃO

A modelagem matemática é uma importante ferramenta utilizada para avaliar o crescimento de microrganismos em alimentos. O uso de modelos preditivos tem crescido devido à habilidade de predição do crescimento microbiano em condições específicas e pela facilidade do uso de computadores e *software* de simulação (MAFART, 2005; McMEEKIN; MELLEFONT; ROSS, 2007).

A estabilidade microbiana dos alimentos é afetada por diversos fatores, como temperatura, pH e atividade de água, sendo que a temperatura é um fator que pode variar extensivamente dentro da cadeia de produção e distribuição de produtos alimentícios. Como a variação da temperatura modifica a dinâmica do crescimento microbiano durante o armazenamento de alimentos, o uso de modelos matemáticos que consideram essas variações pode ser muito útil na predição da vida de prateleira de alimentos (VAN IMPE et al., 1992).

Os modelos matemáticos para avaliar o crescimento microbiano podem ser divididos em modelos primários, os quais medem a resposta dos microrganismos com o tempo para um conjunto de condições ambientais; modelos secundários, os quais descrevem a resposta de um ou mais parâmetros do modelo primário com a modificação de uma ou mais condições ambientais de cultura; e modelos terciários, obtidos pela combinação de modelos primários e secundários para gerar sistemas que fornecem predições para diferentes condições ambientais (WHITING; BUCHANAN, 1993). Os modelos também podem ser classificados matematicamente em: (i) modelos puramente sigmoidais, (ii) modelos sigmoidais com função de ajuste e (iii) modelos segmentados (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004).

Diversos modelos matemáticos têm sido propostos na literatura para a predição do crescimento microbiano em condições ambientais não-isotérmicas. A Tabela 3.1 sumariza os modelos matemáticos de interesse para o presente estudo. Os estudos que avaliam o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas utilizam principalmente os modelos BAR (BARANYI et al., 1995; BOVILL et al., 2000; XANTHIAKOS et al., 2006; LEE et al., 2007; GOSPAVIC et al., 2008; JUNEJA et al., 2011; VELUGOTI et al., 2011), GOM (VAN IMPE et al., 1992; ZWIETERING et al., 1994; HUANG, 2003) e LMZ (KREYENSCHMIDT et al., 2010).

Tabela 3.1 – Classificação, nomenclatura, abreviação e fonte dos modelos matemáticos de interesse para o presente estudo.

Classificação	Modelo	Abreviação	Referência
Puramente sigmoidais	Logístico modificado por Zwietering e colaboradores	LMZ	Zwietering et al. (1990)
	Gompertz modificado por Zwietering e colaboradores	GOM	Zwietering et al. (1990)
	Logístico modificado por Corradini e Peleg	LCP	Corradini e Peleg (2005)
Sigmoidais com função de ajuste	Baranyi e Roberts	BAR	Baranyi e Roberts (1994)
	Fujikawa, Kai e Morozumi	FKM	Fujikawa, Kai e Morozumi (2004)
	Huang	HUA	Huang (2008)

Estudos de comparação entre modelos matemáticos têm sido realizados apenas para o crescimento microbiano em condições isotérmicas (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004; JUNEJA et al., 2007; PAL; LABUZA; DIEZ-GONZALEZ, 2008), sendo que trabalhos de comparação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para situações de crescimento microbiano em condições não-isotérmicas são escassas na literatura (GOSPAVIC et al., 2008).

As bactérias ácido-lácticas (LAB) são responsáveis pela deterioração de produtos cárneos processados, embalados a vácuo ou em

atmosfera modificada, e armazenados sob temperaturas de refrigeração (BORCH; KANTMUERMANS; BLIXT, 1996). A deterioração causada pelas LAB é primordialmente devido à produção de metabólitos que causam mudanças indesejáveis na aparência, textura e *flavor* do alimento, produzindo odores e sabores desagradáveis, além da formação de limo na superfície dos produtos (SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000; CAYRE; VIGNOLO; GARRO, 2003; NYCHAS et al., 2008). *Lactobacillus plantarum* pode ser considerada uma das principais LAB (HUGAS, 1998), tendo recebido atenção de pesquisadores em estudos envolvendo a modelagem matemática de seu crescimento em produtos cárneos (ZWIETERING et al., 1990; VAN IMPE et al., 1995; GARCIA-GIMENO; HERVAS-MARTINEZ; DE SILONIZ, 2002). Devido à sua importância, essa LAB foi selecionada para este estudo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho dos modelos LMZ, GOM, LCP, BAR, FKM e HUA para a predição do crescimento de *Lactobacillus plantarum* em meio MRS sob condições não-isotérmicas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A bactéria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* (CCT 0580 ATCC 8014, Lote 07.05) utilizada no estudo foi adquirida na forma liofilizada da coleção de culturas da Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, Brasil). As cepas foram reidratadas conforme indicação, cultivadas em meio Man, Rugosa e Sharpe (MRS) – *Lactobacillus* (Acumedia Manufactures, Inc. Lansing, Michigan, USA) e estocadas em tubos *ependorf* com meio MRS contendo 20% de glicerol a -24 °C até a utilização.

3.2.2 Condições de crescimento

A reativação da cultura para o preparo dos inóculos foi realizada em meio MRS a 30 °C por 18 horas. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 160 mL de meio MRS e 1% (v/v) de inóculo. Os frascos foram incubados em estufa (Dist. Florianópolis, Brasil) em diferentes condições isotérmicas: temperaturas de refrigeração (4 e 8 °C), temperaturas abusivas (12, 16 e 20 °C) e temperatura ótima de crescimento (30 °C). Todos os experimentos

isotérmicos foram feitos em duplicata. As condições não-isotérmicas foram testadas com mudanças na temperatura a cada 12 horas, em estufas com programação automática de temperatura (Dist, Florianópolis, Brasil). Foram aplicados três perfis de temperaturas diferentes. No perfil chamado 4-12 °C, foi testada a variação entre 4 °C e 12 °C; no perfil chamado 5-15 °C, foi testada a variação entre 5 °C e 15 °C; e no perfil chamado 20-30 °C, foi testada a variação entre 20 °C e 30 °C. Para os três perfis (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C) o experimento sempre foi iniciado a partir da menor temperatura e as mudanças de temperatura foram realizadas a cada 12 horas de experimento. Em todos os experimentos (isotérmicos e não-isotérmicos), a temperatura foi registrada a cada 5 minutos por mini *data loggers* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha), sendo conduzidos até a fase estacionária do crescimento.

3.2.3 Coleta de dados experimentais

Amostras de 2 mL foram coletadas assepticamente em câmara de fluxo laminar (CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil) em intervalos de tempo pré-estabelecidos, e medidas da absorbância em espectrofotômetro (1105, Bel Photonics, Monza, Itália) foram realizadas em comprimento de onda de 600 nm, em cubetas de vidro. O branco utilizado foi água destilada, descontado das medidas finais. A faixa de absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8, sendo efetuadas diluições a partir deste valor para manter a linearidade. Os dados de absorbância foram transformados em contagem de colônias através da utilização de curvas de calibração obtidas previamente em laboratório, com alto coeficiente de determinação ($R^2 > 0,98$).

3.2.4 Modelagem matemática

3.2.4.1 Modelos primários

Os modelos matemáticos de crescimento microbiano utilizados neste estudo são apresentados na Tabela 3.2, sendo que para todos os modelos, $y(t)$ é o logaritmo natural da contagem bacteriana N (UFC/mL) no tempo t (horas), ou seja, $y(t) = \ln(N(t))$, e $Y(t)$ é o logaritmo da razão entre a contagem bacteriana N no tempo t e a contagem bacteriana inicial N_0 , ou seja, $Y(t) = \ln(N(t)/N_0)$. O parâmetro μ_{max} é a velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1});

λ é a duração da fase lag (h); y_0 é o logaritmo natural da contagem bacteriana inicial, $y_0 = \ln(N_0)$; y_{max} é o logaritmo natural da contagem bacteriana máxima atingida $y_{max} = \ln(N_{max})$; k e r correspondem à inclinação máxima da curva do logaritmo do crescimento (h^{-1}); t_{ifx} é o tempo de inflexão da curva (h); A é amplitude da curva, que corresponde ao logaritmo da razão entre a contagem bacteriana máxima e a contagem bacteriana inicial, $A = \ln(N_{max}/N_0)$; h_0 é o estado fisiológico inicial das células; α e c são parâmetros de curvatura; $B(t)$ e $F(t)$ são funções dos modelos HUA e BAR, respectivamente.

Tabela 3.2 – Equações dos modelos primários utilizados no presente estudo.

Modelo	Equação
LMZ	$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{4\mu_{max}}{A}[\lambda - t] + 2\right)} \quad (3.1)$
GOM	$Y(t) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\exp(1)\mu_{max}}{A}[\lambda - t] + 1\right)\right) \quad (3.2)$
LCP	$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp(k[t_{ifx} - t])} - \frac{A}{1 + \exp(kt_{ifx})} \quad (3.3)$
BAR	$y(t) = y_0 + \mu_{max}F(t) - \ln\left(1 + \frac{\exp(\mu_{max}F(t)) - 1}{\exp(y_{max} - y_0)}\right) \quad (3.4)$
	$F(t) = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}}\right)\ln(\exp(-\mu_{max}t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{max}t - h_0)) \quad (3.5)$
FKM	$\frac{dy(t)}{dt} = r[1 - \exp(y_{min} - y(t))]^c [1 - \exp(y(t) - y_{max})] \quad (3.6)$
HUA	$y(t) = y_0 + y_{max} - \ln(\exp(y_0) + [\exp(y_{max}) - \exp(y_0)] \exp(-\mu_{max}B(t))) \quad (3.7)$
	$B(t) = t + \left[\frac{1}{\alpha}\right] \ln\left\{\frac{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])}{1 + \exp(\lambda\alpha)}\right\} \quad (3.8)$

Para cada modelo, as metodologias utilizadas para estimar os parâmetros foram baseadas nas propostas de seus autores, conforme descrito a seguir. O método matemático de regressão não-linear é descrito no tópico que trata das análises numéricas.

Para os modelos puramente sigmoidais LMZ, GOM e LCP, as estimativas dos parâmetros foram realizadas pelos ajustes dos modelos aos dados experimentais. Para o modelo BAR, a estimativa foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, a estimativa dos parâmetros foi realizada pelo ajuste do modelo aos dados experimentais. A média aritmética entre os valores do parâmetro h_0 para todas as temperaturas

foi calculada. Na segunda etapa, o parâmetro h_0 foi fixado com o valor da média calculada, e os parâmetros y_0 , y_{max} e μ_{max} foram estimados por novo ajuste.

Para o modelo FKM, os parâmetros y_{min} e y_{max} foram estimados através dos valores iniciais e finais das curvas experimentais, sendo estes valores acrescidos e subtraídos de 1 parte por milhão (FUJIKAWA; KAI; MOROZUMI, 2004). O valor do parâmetro r foi obtido pela inclinação da reta ajustada aos pontos experimentais na fase exponencial. Por fim, o parâmetro c foi estimado como o valor que minimiza o somatório dos quadrados residuais entre o modelo e os dados experimentais.

Para o modelo HUA, a estimativa dos parâmetros foi realizada de duas formas diferentes: com o valor do parâmetro α fixo em 25 (conforme sugerido pelo autor) e com a estimativa do parâmetro α pelo ajuste. No segundo caso, uma função linear foi usada para descrever a dependência dos valores estimados de α com a temperatura; então, o parâmetro α foi fixo em cada temperatura, e os parâmetros y_0 , y_{max} , λ e μ_{max} foram estimados por novo ajuste.

3.2.4.2 Modelos secundários

O modelo da raiz quadrada de Ratkowsky et al. (1982) é muito utilizado para modelar o efeito da temperatura sobre os parâmetros dos modelos primários (BARANYI et al., 1995; XANTHIAKOS et al., 2006; LEE et al., 2007; GOSPAVIC et al., 2008). O modelo da raiz quadrada é apresentado na Equação (3.9), sendo que T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), T_{min} é a temperatura teórica de mínimo crescimento microbiano ($^{\circ}\text{C}$), b é um parâmetro empírico do modelo ($^{\circ}\text{C}^{-1}\text{h}^{-0.5}$) e p é o parâmetro modelado em função da temperatura ($\text{h}^{-0.5}$). O modelo da raiz quadrada foi utilizado como modelo secundário para os parâmetros μ_{max} , r , k , λ e t_c , onde o parâmetro p foi substituído por μ_{max} , r , k , $(1/\lambda)$ e $(1/t_c)$, respectivamente, sendo os parâmetros b e T_{min} estimados através de ajuste.

$$\sqrt{p} = b(T - T_{min}) \quad (3.9)$$

A média aritmética dos valores do parâmetro c para todas as temperaturas pode ser utilizada como modelo secundário. Para os parâmetros y_{max} e A , a média aritmética foi calculada com os valores destes parâmetros nas temperaturas de cada perfil.

3.2.4.3 Predição do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas

Para a modelagem do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas os modelos são utilizados como equações diferenciais de primeira ordem, com as respectivas condições iniciais, conforme apresentado na Tabela 3.3. Para os modelos LMZ e GOM, as equações diferenciais correspondem à abordagem proposta por Van Impe et al. (1992).

Na Tabela 3.3, y_0 é o valor da contagem bacteriana inicial; μ_{max} , λ e A nas Equações (3.12) e (3.14) correspondem aos valores destes parâmetros na temperatura de incubação, $Q(t)$ é uma função do estado fisiológico das células, onde Q_0 se relaciona com o parâmetro h_0 através da Equação (3.10).

$$Q_0 = -\ln(\exp(h_0) - 1) \quad (3.10)$$

Todos os parâmetros das equações diferenciais são funções da temperatura, dadas por modelos secundários. O perfil da variação da temperatura com o tempo foi descrito através de funções apropriadas.

3.2.5 Análises numéricas

Rotinas computacionais foram programadas e executadas no *software* Matlab para cada um dos modelos, usando *m files*. Os ajustes dos modelos aos dados experimentais foram realizados através da função *fit* da ferramenta *curve fitting tool* do Matlab, com a utilização do método dos mínimos quadrados não linear e do algoritmo *trust region reflective Newton*. O valor para a tentativa inicial de cada parâmetro foi selecionado a partir da observação das curvas experimentais. A resolução das equações diferenciais foi feita através da função *ode23* do Matlab, que é baseada no método de Runge-Kutta, aplicando as condições iniciais adequadas a cada modelo (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Equações diferenciais e condições iniciais utilizadas na modelagem do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas.

Modelo	Equação diferencial	Condição inicial
LMZ*	$\frac{dY(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{A}{A} \right] \left[1 - \frac{Y(t)}{A} \right] Y(t)$	(3.11)
	$Y(0) = \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{4\lambda\mu_{max}}{A} + 2\right)}$	(3.12)
GOM*	$\frac{dY(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{\exp(1)}{A} \right] \ln\left(\frac{A}{Y(t)}\right) Y(t)$	(3.13)
	$Y(0) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\lambda\mu_{max} \exp(1)}{A} + 1\right)\right)$	(3.14)
LCP	$\frac{dY(t)}{dt} = \frac{kA \exp(k[t_{ifx} - t^*])}{[1 + \exp(k[t_{ifx} - t^*])]^2}$	(3.15)
	$t^* = \left[\frac{1}{k} \right] \ln\left(\frac{\exp(kt_{ifx}) [A + Y(t) [1 + \exp(kt_{ifx})]]}{A \exp(kt_{ifx}) - Y(t) [1 + \exp(kt_{ifx})]}\right)$	(3.16)
	$Y(0) = 0$	(3.17)
BAR	$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] [1 - \exp(y(t) - y_{max})]$	(3.18)
	$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{max}$	(3.19)
	$y(0) = y_0$	(3.20)
	$Q(0) = Q_0$	(3.21)
FKM	$\frac{dy(t)}{dt} = r [1 - \exp(y_{min} - y(t))]^c [1 - \exp(y(t) - y_{max})]$	(3.6)
	$y(0) = y_0$	(3.20)
HUA	$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{1}{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])} \right] [1 - \exp(y(t) - y_{max})]$	(3.22)
	$y(0) = y_0$	(3.20)

*As equações diferenciais dos modelos LMZ e GOM correspondem à abordagem proposta por Van Impe et al. (1992).

3.2.6 Análises estatísticas

A capacidade dos modelos isotérmicos de representar os dados experimentais nas diferentes temperaturas foi avaliada através da raiz do erro médio quadrático (*RMSE*) e do coeficiente de determinação ajustado (R^2 -ajustado). O *RMSE* foi calculado conforme a Equação (3.23), onde pd_i são os valores preditos pelo modelo, ob_i são os valores observados nos experimentos, num é o número de pontos experimentais, e var é o número de variáveis significativas do modelo avaliado.

$$RMSE = \left[\frac{1}{num - var} \right] \sqrt{\sum_{i=1}^{num} (pd_i - ob_i)^2} \quad (3.23)$$

O R^2 -ajustado é baseado no coeficiente de correlação de Pearson (SOPER et al., 1917) elevado ao quadrado, no número de pontos experimentais e variáveis significativas, sendo calculado conforme a Equação (3.24).

$$R_{aj}^2 = 1 - \left[\frac{num - 1}{num - var + 1} \right] \left[1 - \frac{[\sum (pd_i - \overline{pd})][\sum (ob_i - \overline{ob})]}{\sum (pd_i - \overline{pd})^2 \sum (ob_i - \overline{ob})^2} \right]^2 \quad (3.24)$$

A comparação entre os valores experimentais observados e as respostas preditas pelos modelos não-isotérmicos foi realizada com a utilização do *RMSE* e dos fatores *bias* e *accuracy* (ROSS, 1996), apresentados nas Equações (3.25) e (3.26), respectivamente.

$$bias = 10^{\frac{\sum \log(pd/ob)}{n}} \quad (3.25)$$

$$accuracy = 10^{\frac{\sum |\log(pd/ob)|}{n}} \quad (3.26)$$

Fatores *bias* e *accuracy* iguais a 1 indicam acordo perfeito entre valores preditos e observados. Para curvas de crescimento microbiano, um fator *bias* maior que 1 indica que o modelo falha de forma segura (*fail-safe*), enquanto fator *bias* menor que 1 indica que o modelo falha de forma perigosa (*fail-dangerous*). O fator *accuracy* é sempre maior ou igual a 1, sendo que quanto maior o seu valor, menos precisa é a média das estimativas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Modelos primários

Os ajustes de todos os modelos aos dados experimentais do crescimento de *L. plantarum* em meio MRS foram muitos bons, com valores de R_{aj}^2 iguais ou acima de 0,990 e *RMSE* iguais ou abaixo de 0,072, conforme dados da Tabela 3.4.

Tabela 3.4 –*RMSE* para os ajustes dos modelos aos dados de crescimento de *L. plantarum* a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

Modelo	Temperatura					
	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	30 °C
LMZ	0,032	0,058	0,069	0,040	0,072	0,061
GOM	0,027	0,047	0,029	0,048	0,035	0,040
LCP	0,026	0,047	0,051	0,037	0,050	0,044
BAR	0,027	0,048	0,048	0,047	0,053	0,047
FKM	0,033	0,052	0,045	0,046	0,056	0,047
HUA	0,030	0,056	0,026	0,045	0,037	0,045

Com relação à estimativa dos parâmetros dos modelos, o valor da média aritmética calculada para o parâmetro h_0 do modelo BAR, na primeira etapa de ajuste, foi 1,844 (com desvio padrão da média igual a 0,373). Os ajustes do modelo HUA com o parâmetro α igual a 25 não foram os melhores para este modelo. Os ajustes sem a fixação de valores para o parâmetro α apresentaram melhores índices estatísticos, onde a função linear $\alpha = 0,035T - 0,116$ descreveu bem a dependência deste parâmetro com a temperatura.

Na Tabela 3.4 é possível verificar que o modelo LMZ resultou em valores de *RMSE* relativamente maiores em relação aos outros modelos (mais que 25%) em três temperaturas (12, 20 e 30 °C). A menor capacidade de ajuste pode ser explicada pela simetria do modelo LMZ em torno do ponto de inflexão. Na Figura 3.1 são apresentados os ajustes dos modelos LMZ e GOM aos dados de crescimento de *L. plantarum* na temperatura de 12 °C e os resíduos destes ajustes. Observam-se resíduos relativamente maiores para o modelo LMZ, que superestimou os valores da condição inicial e da velocidade máxima

específica de crescimento em relação ao modelo GOM e aos dados experimentais.

O modelo GOM resultou em baixos valores de *RMSE* em todas as temperaturas. O bom desempenho do modelo GOM aplicado a dados de crescimento de *L. plantarum* em condições isotérmicas já havia sido verificado por Zwietering et al. (1990). A Figura 3.2 apresenta o ajuste do modelo GOM aos dados experimentais do crescimento de *L. plantarum* para todas as temperaturas.

Figura 3.1 – Gráficos de comparação entre os ajustes pelos modelos puramente sigmoidais LMZ e GOM aos dados na temperatura de 12 °C (figura superior) e de resíduos dos ajustes (figura inferior).

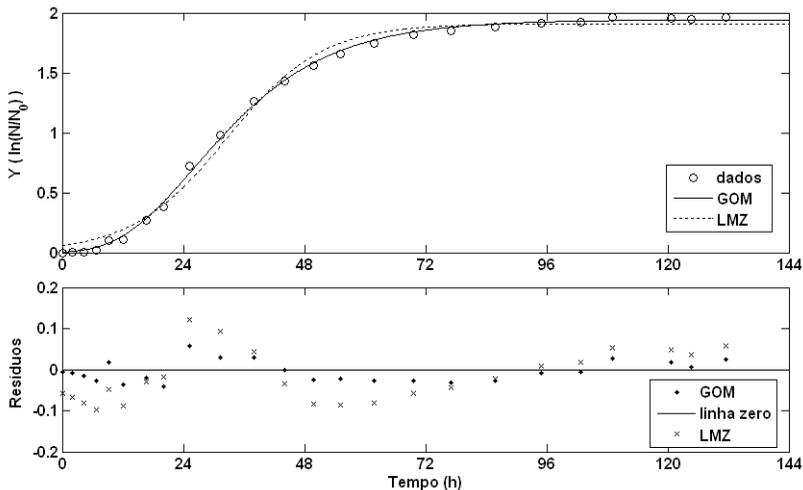
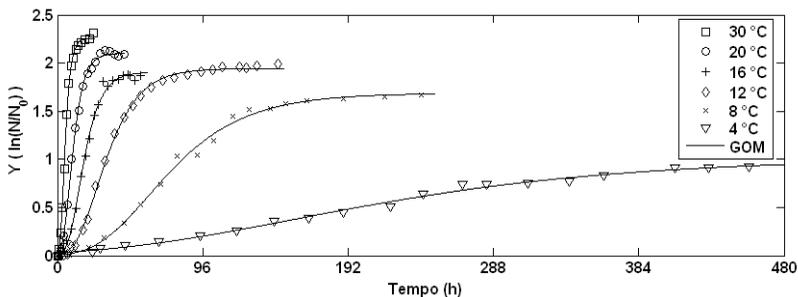


Figura 3.2 – Ajuste do modelo GOM aos dados do crescimento de *L. plantarum* nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.



A literatura relata que um dado modelo pode ser mais apropriado para descrever a curva de crescimento de um microrganismo específico. Baty e Delignette-Muller (2004) verificaram que os ajustes dos modelos GOM, BAR e Lag-Exponencial a dados do crescimento isotérmico de *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* não foram significativamente diferentes. Entretanto, o modelo BAR apresentou os menores desvios e resíduos na maior parte dos casos. Juneja et al. (2007) testaram os modelos GOM, BAR e Logístico a dados do crescimento isotérmico de *Salmonella* e mostraram que o modelo Logístico representou melhor os dados experimentais, segundo os critérios Akaike e Sawa (AIC e BIC). Em geral, todos os modelos avaliados ajustaram bem os dados de crescimento de *L. plantarum* em todas as temperaturas. De acordo com Baty e Delignette-Muller (2004), quando a quantidade disponível de dados do crescimento microbiano é menor, e longas fases lag são observadas, modelos sigmoidais com função de ajuste podem ser mais hábeis em descrever o crescimento microbiano em relação aos modelos puramente sigmoidais.

3.3.2 Modelos secundários

Foram obtidos bons ajustes do modelo secundário da raiz quadrada (Equação (3.9)) aos dados dos parâmetros μ_{max} , k , r , λ e t_c dos modelos primários em função da temperatura, com valores de R_{aj}^2 maiores que 0,965, e $RMSE$ menores que 0,040, para todos os casos, como mostrado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Valores dos parâmetros b e T_{min} estimados pelo ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados dos parâmetros μ_{max} , k , r , λ e t_c dos modelos primários, e valores de R_{aj}^2 e $RMSE$.

Modelo	p	b ($^{\circ}\text{C}^{-1}\text{h}^{-0,5}$)	T_{min} ($^{\circ}\text{C}$)	R_{aj}^2	$RMSE$
LMZ	μ_{max}	0,0207	1,26	0,999	0,005
GOM	μ_{max}	0,0203	1,23	0,998	0,008
LCP	k	0,0247	-0,25	0,996	0,014
	$1/t_c$	0,0150	-0,57	0,993	0,012
BAR	μ_{max}	0,0260	0,08	0,997	0,014
FKM	r	0,0252	-0,32	0,999	0,007
HUA	μ_{max}	0,0243	0,73	0,997	0,012
	$1/\lambda$	0,0224	-0,77	0,965	0,040

Para o parâmetro c do modelo FKM, o valor obtido para a média aritmética foi 0,503 (com desvio padrão da média igual a 0,020). Os valores da média aritmética dos parâmetros A e y_{max} de cada modelo são apresentados na Tabela 3.6, assim como o valor da população máxima observada nos experimentos para cada um dos perfis de temperatura. É possível notar que os valores das médias aritméticas do parâmetro y_{max} dos modelos BAR, FKM e HUA e do parâmetro A do modelo LCP para os perfis não-isotérmicos (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C) foram maiores que os valores observados nos experimentos (OBS). Já os valores das médias aritméticas para o parâmetro A dos modelos LMZ e GOM foram menores que os valores observados nos experimentos dos perfis 4-12 °C e 5-15 °C. A consequência das diferenças entre valores preditos pelas médias e observados nos experimentos na predição do crescimento em condições não-isotérmicas será discutida posteriormente.

Tabela 3.6 – Valores da média aritmética dos parâmetros A e y_{max} para cada modelo (LMZ, GOM, LCP, BAR, FKM e HUA) e a população máxima observada nos experimentos (OBS) nos três perfis de temperatura (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C).

Modelo	Parâmetro	Média para cada perfil		
		4-12 °C	5-15 °C	20-30 °C
LMZ		1,42	1,57	2,14
GOM	A	1,48	1,62	2,18
LCP	$(\ln(N/N_0))$	1,63	1,74	2,34
OBS		1,52	1,72	2,06
BAR		22,96	23,14	23,58
FKM	y_{max}	22,97	23,15	23,59
HUA	$(\ln(N))$	23,03	23,18	23,60
OBS		22,87	23,07	23,40

3.3.3 Predições do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas

Os valores de $RMSE$, fatores $bias$ e $accuracy$ das predições do crescimento de *L. plantarum* por todos os modelos avaliados neste estudo (Tabela 3.3), para os três perfis não-isotérmicos (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C), são apresentados na

Tabela 3.7. Verifica-se que todos os modelos testados apresentaram previsões seguras, com fator $bias$ maior que 1.

Nos perfis de temperatura 4-12 °C e 5-15 °C o modelo LCP apresentou as predições do crescimento mais próximas aos dados experimentais em relação aos outros modelos. No perfil de temperatura 20-30 °C o modelo GOM foi o que apresentou a melhor capacidade preditiva (Tabela 3.7). O modelo HUA apresentou a menor capacidade preditiva nas três condições não-isotérmicas. As predições do crescimento pelos modelos LMZ, GOM, BAR e FKM para essas condições foram próximas entre si.

Tabela 3.7 – *RMSE*, fatores *bias* e *accuracy* para a predição do crescimento de *L. plantarum* pelos modelos nos três perfis de temperatura (4-12 °C, 5-15 °C e 20-30 °C).

Modelo	<i>RMSE</i>			<i>Bias</i>			<i>Accuracy</i>		
	4-12	5-15	20-30	4-12	5-15	20-30	4-12	5-15	20-30
LMZ	0,278	0,182	0,136	1,215	1,115	1,105	1,235	1,158	1,110
GOM	0,347	0,255	0,116	1,295	1,181	1,082	1,301	1,213	1,082
LCP	0,193	0,103	0,144	1,159	1,052	1,112	1,162	1,085	1,112
BAR	0,266	0,194	0,199	1,236	1,165	1,145	1,238	1,167	1,145
FKM	0,285	0,213	0,200	1,247	1,177	1,148	1,251	1,181	1,148
HUA	0,461	0,450	0,213	1,444	1,402	1,133	1,446	1,408	1,138

As temperaturas moderadas do perfil 20-30 °C contribuíram para as boas respostas de predição dos modelos. O modelo GOM teve um bom desempenho neste perfil porque descreveu muito bem os dados experimentais de crescimento em condições isotérmicas, e os valores do parâmetro μ_{max} foram bem descritos pelo modelo secundário da raiz quadrada. As diferentes capacidades preditivas dos modelos estão relacionadas com o efeito dos modelos secundários e das dificuldades de predição do comportamento microbiano em condições não-isotérmicas, conforme discutido a seguir.

3.3.4 O efeito dos modelos secundários nas predições do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas

Os erros nas estimativas dos valores dos parâmetros μ_{max} , k , r , λ e t_c , causados pelos modelos secundários, ocasionaram erros nas predições do crescimento em condições não-isotérmicas. Analisou-se o efeito dos modelos secundários dos parâmetros k e t_c do modelo LCP (Figura 3.3), e μ_{max} e λ do modelo HUA (Figura 3.4) na descrição do crescimento isotérmico de *L. plantarum* a 12 °C, e na predição do crescimento para o perfil 4-12 °C.

Figura 3.3 – Dados do crescimento isotérmico de *L. plantarum* a 12 °C (dados 12 °C), estimativa do crescimento isotérmico pelo modelo LCP com o uso dos modelos secundários para k e t_c (LCP 12 °C), dados do crescimento não-isotérmico do microrganismo no perfil 4-12 °C (dados 4-12 °C), predição do crescimento não-isotérmico pelo modelo LCP (LCP 4-12 °C) e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).

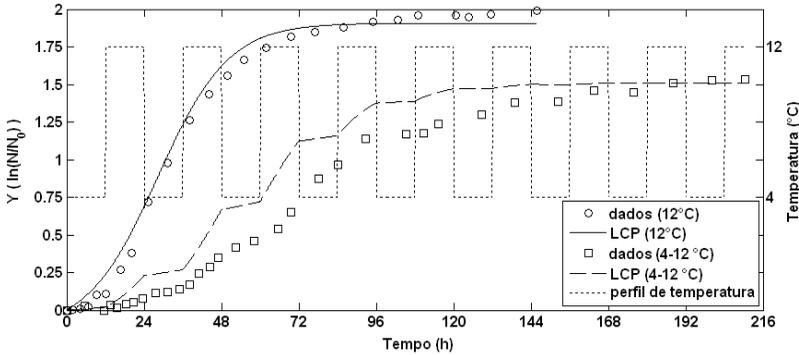
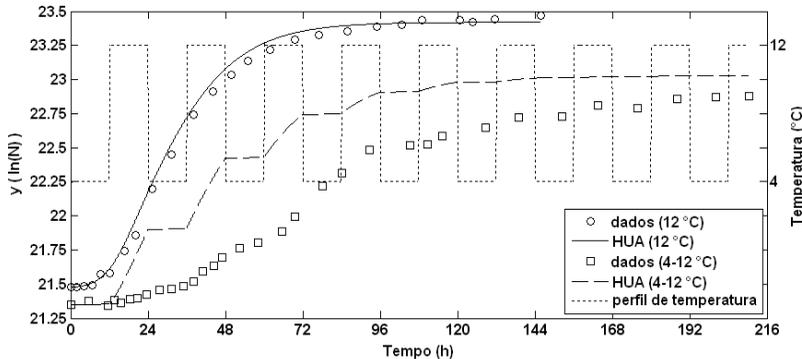


Figura 3.4 – Dados do crescimento isotérmico de *L. plantarum* a 12 °C (dados 12 °C), estimativa do crescimento isotérmico pelo modelo HUA com o uso dos modelos secundários para μ_{max} e λ (HUA 12 °C), dados do crescimento não-isotérmico do microrganismo no perfil 4-12 °C (dados 4-12 °C), predição do crescimento não-isotérmico pelo modelo HUA (HUA 4-12 °C) e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).



O modelo LCP não teve boa capacidade preditiva para condições isotérmicas (12 °C) no início da curva e subestimou a inclinação na parte exponencial da curva. Isso é atribuído à incapacidade do modelo secundário em representar a variação dos parâmetros do modelo primário com a temperatura. Se o modelo secundário representasse perfeitamente essas variações, seria possível reproduzir o modelo primário a partir do modelo não-isotérmico, para uma dada temperatura. Com isso, o modelo não-isotérmico teria maior capacidade preditiva do crescimento microbiano para toda temperatura dentro da faixa investigada (condição isotérmica). Assim, o modelo LCP subestimou o crescimento microbiano para o perfil 4-12 °C em relação aos outros modelos. O modelo HUA descreveu bem os dados isotérmicos a 12 °C no início da curva, mas superestimou a inclinação da parte exponencial da curva de crescimento. Assim, o crescimento não-isotérmico para o perfil 4-12 °C foi superestimado pelo modelo HUA.

Analisou-se também o efeito do uso do modelo secundário do parâmetro μ_{max} do modelo GOM na descrição do crescimento isotérmico de *L. plantarum* a 20 °C e 30 °C, e na predição do crescimento para o perfil 20-30 °C (Figura 3.5). Observa-se que o modelo GOM descreve bem os dados isotérmicos a 20 °C e a 30 °C com o uso do modelo secundário do parâmetro μ_{max} , o que leva a uma boa predição do crescimento microbiano para o perfil 20-30 °C.

Para verificar o efeito dos parâmetros y_{max} e A na predição do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas, aplicaram-se a estes parâmetros os valores observados nos experimentos (Tabela 3.6). Observou-se que o aumento do valor do parâmetro A para os modelos LMZ e GOM causou um deslocamento para baixo da parte inicial da curva de crescimento. Após um determinado tempo, antes da fase estacionária, as curvas se interceptaram e a predição da parte final da curva foi melhor quando se usou o dado experimental do parâmetro A no modelo, como esperado. Na Figura 3.6, este comportamento pode ser observado para o perfil 5-15 °C, usando o modelo LMZ para a predição, com interceptação das curvas ocorrendo para aproximadamente 48 horas de cultura.

O aumento do valor do parâmetro y_{max} para os modelos BAR, FKM e HUA, e A para o modelo LCP causou deslocamento de toda curva para cima, pouco importante na parte inicial e maior quando a cultura está próxima da população máxima. Na Figura 3.7 apresenta-se este comportamento para o perfil 5-15 °C com o modelo BAR.

Figura 3.5 – Dados do crescimento isotérmico de *L. plantarum* a 20 °C (dados 20 °C) e a 30 °C (dados 30 °C), estimativa do crescimento isotérmico pelo modelo GOM com o uso do modelo secundário para μ_{max} (GOM 20 °C, e GOM 30 °C), dados do crescimento não-isotérmico do microrganismo no perfil de temperatura 20-30 °C (dados 20-30 °C), predição do crescimento não-isotérmico pelo modelo GOM (GOM 20-30 °C) e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).

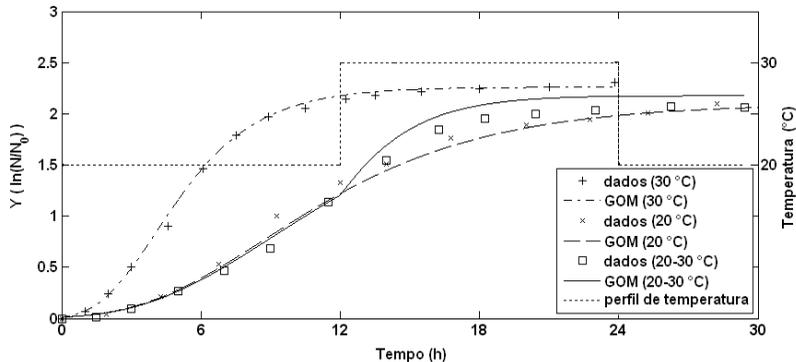


Figura 3.6 – Dados do crescimento não-isotérmico de *L. plantarum* no perfil de temperatura 5-15 °C (dados 5-15 °C), estimativas do crescimento não-isotérmico pelo modelo LMZ com o valor do parâmetro A observado nos experimentos (LMZ A_{obs}) e com o valor de A obtido da média aritmética (LMZ A_{pdt}), e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).

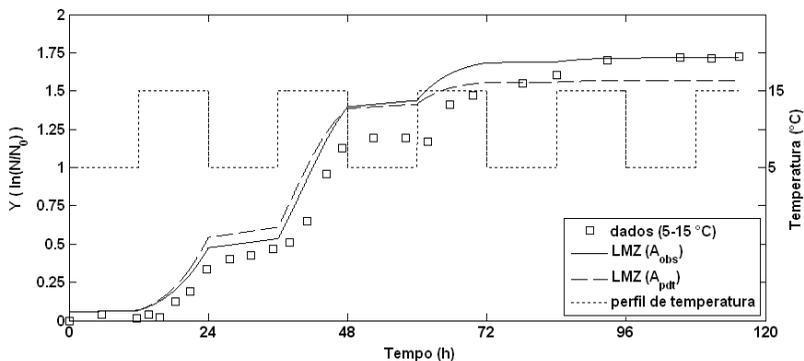
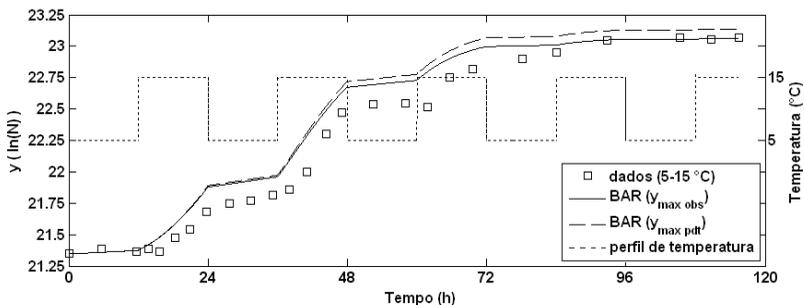


Figura 3.7 – Dados do crescimento não-isotérmico de *L. plantarum* no perfil de temperatura 5-15 °C (dados 5-15 °C), estimativas do crescimento não-isotérmico pelo modelo BAR com o valor do parâmetro y_{max} observado nos experimentos (BAR $y_{max\text{ obs}}$) e com o valor de y_{max} obtido da média aritmética (BAR $y_{max\text{ pdt}}$), e perfil da variação da temperatura com o tempo (perfil de temperatura).



De forma geral, foi possível verificar que a quantidade de modelos secundários, assim como a habilidade destes modelos de representar a dependência dos parâmetros com a temperatura, influenciou a predição do crescimento em condições não-isotérmicas pelos modelos matemáticos testados. Esses resultados estão de acordo com a literatura. Por exemplo, Juneja et al. (2007) afirmaram que o desempenho de um modelo para predição do crescimento em condições não-isotérmico depende do desempenho dos modelos primários e secundários.

3.3.5 Dificuldades de predição do comportamento microbiano em condições não-isotérmicas

Segundo Swinnen et al. (2004) as variações ambientais súbitas podem resultar em atrasos no crescimento microbiano, conhecidas como fases lag intermediárias. Fu, Taoukis e Labuza (1991) mostraram que a capacidade preditiva dos modelos é melhor quando ocorrem mudanças graduais na temperatura da cultura microbiana, conforme observado para o perfil 20-30 °C deste estudo.

Mudanças bruscas de temperatura, especialmente em torno da temperatura teórica de mínimo crescimento (T_{min}) causam uma nova fase de adaptação que não pode ser predita pelos modelos apresentados, conforme observado para os perfis 4-12 °C e 5-15 °C deste estudo. Zwietering et al. (1994) modelaram o crescimento de *L. plantarum* com

a utilização do modelo GOM e adicionaram o termo λ_{shift} , utilizado para representar um tempo de adaptação intermediária do microrganismo após uma mudança na temperatura. Essa modificação melhorou as predições em 73% dos casos testados. Porém, a capacidade preditiva do modelo continuou baixa para temperaturas próximas de T_{min} .

Juneja et al. (2007) afirmaram que a capacidade preditiva dos modelos em condições não-isotérmicas depende do desempenho dos modelos primários e secundários, o que pôde ser verificado neste trabalho. Além disso, os resultados indicam que as respostas microbianas às variações bruscas de temperatura são de difícil predição, onde a incorporação dos complexos mecanismos de adaptação microbiana aos modelos preditivos é um desafio a ser enfrentado pelos pesquisadores.

3.4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o bom desempenho de um modelo matemático para a predição do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas depende de alguns fatores, como:

- O modelo primário deve representar muito bem os dados do crescimento em condições isotérmicas;
- Os modelos secundários escolhidos devem representar muito bem a variação dos parâmetros do modelo primário em função da temperatura;
- Modelos com parâmetros que possuem algum significado biológico são desejáveis, pois os resultados podem ser usados para melhorar a compreensão do comportamento microbiano sob as condições estudadas;
- A capacidade preditiva dos modelos matemáticos é menor quando ocorrem variações bruscas de temperatura.

De maneira geral, as predições do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas foram superestimadas pelos modelos matemáticos. Não foi possível apontar um modelo com melhor capacidade preditiva para condições não-isotérmicas, embora o modelo LCP tenha apresentado, em geral, melhores valores de *RMSE*, fatores *bias e accuracy* em relação aos modelos LMZ, GOM, BAR e FKM, enquanto o modelo HUA apresentou a menor capacidade preditiva.

3.5 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Na tese de Dalcanton (2010), o modelo de Gompertz modificado por Zwietering e colaboradores foi utilizado para o ajuste dos dados de crescimento do microrganismo nas condições isotérmicas. As equações da raiz quadrada, exponencial e Arrhenius foram utilizadas como modelos secundários para os parâmetros μ_{max} , λ e A , respectivamente. A equação diferencial do modelo de Gompertz modificado por Zwietering e colaboradores foi obtida através da abordagem de Corradini e Peleg (2005), sendo que esta equação diferencial foi utilizada para prever o crescimento do microrganismo nas condições não-isotérmicas. Os valores de R^2 , MSE, fatores *bias* e *accuracy* das previsões obtidas por Dalcanton são apresentados na Tabela 3.8.

Através da comparação entre os valores dos fatores *bias* e *accuracy* resultantes das previsões do crescimento obtidas por Dalcanton (Tabela 3.8) e dos valores destes fatores obtidos neste trabalho (Tabela 3.7), é possível concluir que a avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos é muito importante porque diferentes modelos podem ser mais adequados para prever melhor o crescimento microbiano em relação ao crescimento observado deste microrganismo.

Tabela 3.8 – Índices estatísticos da predição do crescimento não-isotérmico de *L. plantarum* para os diferentes perfis de temperatura.

Temperature Profiles	Statistical Indices			
	R^2	MSE	Bias	Accuracy
4-12°C	0.859	0.163	1.244	1.435
5-15°C	0.934	0.098	1.139	1.270
20-30°C	0.993	0.018	0.977	1.094

Fonte: Dalcanton (2010).

4 CONCLUSÕES

Os modelos matemáticos para o crescimento microbiano foram classificados de acordo com a estrutura matemática em: modelos puramente sigmoidais e modelos sigmoidais com função de ajuste. Além disso, os modelos matemáticos foram classificados de acordo com os parâmetros, que podem ser empíricos ou com significado biológico. A partir destas classificações, observou-se que os modelos têm estruturas matemáticas muito similares, sendo que alguns podem ser equivalentes a partir de determinadas hipóteses, como o modelo de Baranyi e Roberts (1994) e o modelo de Huang (2008). A substituição do parâmetro α pelo parâmetro μ_{max} no modelo de Huang produz uma expressão matemática equivalente ao modelo de Baranyi e Roberts (Apêndice C).

A modelagem do crescimento microbiano sem considerar a fase estacionária é possível, sendo que os modelos avaliados (Baranyi e Roberts (1994), Huang (2008) e Fujikawa (2010)) apresentam capacidade de descrever o crescimento do diâmetro de *Byssochlamys fulva* em suco de maçã a 25 °Brix, nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C (Apêndice A). Além disso, o modelo de Baranyi e Roberts foi mais indicado para descrever o crescimento de *B. fulva* nestas condições, pois a dependência entre os parâmetros μ_{max} e λ do modelo de Baranyi e Roberts com a temperatura foi descrita através do modelo secundário da raiz quadrada, enquanto os parâmetros empíricos n e α dos modelos de Huang e Fujikawa não mostraram correlação com a temperatura.

As transformações dos parâmetros empíricos dos modelos Genérico de Corradini e Peleg (2005) e Logístico de Corradini e Peleg (2005) para parâmetros com significado biológico (μ_{max} e λ) é possível com a metodologia proposta por Zwietering et al. (1990) (Apêndice B). Há vantagens no uso de parâmetros com significado biológico, como a possibilidade de comparação de seus valores para modelos sigmoidais diferentes, além da maior facilidade em representar a dependência dos parâmetros com a temperatura.

Todos os modelos primários apresentam capacidade para descrever o crescimento de *Lactobacillus plantarum* em condições isotérmicas. As predições do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas foram superestimadas por todos os modelos matemáticos. Não foi possível apontar um modelo com melhor capacidade preditiva para condições não-isotérmicas, embora o modelo Logístico de Corradini e Peleg (2005) tenha apresentado menores

valores de *RMSE* e valores de fatores *bias e accuracy* mais próximos da unidade, em relação aos modelos Logístico modificado por Zwietering et al. (1990), Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990), Baranyi e Roberts (1994) e Fujikawa, Kai e Morozumi (2004). O modelo de Huang (2008) apresentou a menor capacidade preditiva.

O bom desempenho de um modelo matemático para a predição do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas depende de alguns fatores:

- O modelo primário deve representar muito bem os dados do crescimento em condições isotérmicas;
- Os modelos secundários escolhidos devem representar muito bem a variação dos parâmetros do modelo primário em função da temperatura;
- Modelos com parâmetros que possuem algum significado biológico são desejáveis, pois os resultados podem ser usados para melhorar a compreensão do comportamento microbiano sob as condições estudadas e servem para comparação de modelos;
- A capacidade preditiva dos modelos matemáticos é menor quando ocorrem variações bruscas de temperatura, pois os modelos não consideram o tempo de adaptação dos microrganismos na nova condição. Esse efeito é maior para as variações bruscas das condições ambientais.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Vários estudos podem complementar o que foi desenvolvido nessa dissertação. Pode-se citar, por exemplo:

- Avaliação experimental do crescimento de *Lactobacillus plantarum* aplicando variações suaves de temperaturas, simulando condições não-isotérmicas reais de armazenamento. A partir disso, pode-se verificar a capacidade preditiva de modelos matemáticos nessas condições;
- Teste da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos, sem considerar a fase estacionária, para o crescimento de *Byssochlamys fulva* (ou outras espécies) em condições não-isotérmicas;
- Disponibilizar aos pesquisadores de microbiologia preditiva um aplicativo computacional para simular o crescimento microbiano em condições isotérmicas e não-isotérmicas, permitindo ao usuário comparar os diferentes modelos disponíveis.

6 APÊNDICE A – MODELAGEM DO CRESCIMENTO DO DIÂMETRO DE COLÔNIAS DE *Byssochlamys fulva* EM SUCO DE MAÇÃ A 25 °BRIX SEM CONSIDERAR A FASE ESTACIONÁRIA

O laboratório de Engenharia Bioquímica (Engebio) da Universidade Federal de Santa Catarina forneceu as informações do crescimento do diâmetro de colônias de *B. fulva*. Os dados experimentais, assim como a metodologia experimental, foram obtidos no desenvolvimento da tese de doutorado de Andréia Tremarin, os quais foram apresentados em seu Exame de Qualificação de Doutorado em 2011.

Este capítulo foi elaborado como material de apoio ao trabalho principal, com o objetivo de apresentar uma das diferentes aplicações dos modelos matemáticos para o crescimento microbiano.

RESUMO

Fungos resistentes ao calor são apontados como agentes deteriorantes de suco de frutas que passam por processamento térmico. O gênero *Byssochlamys*, por exemplo, é capaz de crescer sob baixas pressões parciais de oxigênio e em ambiente ácidos. A quantificação do crescimento de fungos filamentosos não é uma tarefa fácil, porque estes não crescem como células únicas, mas como hifas filamentosas; por isso, a modelagem do crescimento de fungos filamentosos não tem recebido tanta atenção. A medida do diâmetro das colônias é um dos métodos comumente utilizados para quantificar o crescimento de fungos, sendo que modelos com funções contínuas são práticos para avaliar o crescimento do diâmetro das colônias. O diâmetro atingido pelas colônias de fungos muitas vezes é elevado, ocupando todo o espaço disponível, sendo que não há como avaliar o seu diâmetro máximo atingido. Alguns modelos disponíveis na literatura são aptos a modelar o crescimento de microrganismos com esta consideração. Assim, a capacidade dos modelos de Baranyi e Roberts, Huang e Fujikawa em descrever o crescimento do diâmetro de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix, nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C, sem considerar a fase estacionária do crescimento foi avaliada. Os modelos de Baranyi e Roberts, Huang e Fujikawa apresentaram uma boa capacidade para descrever o crescimento do diâmetro de *B. fulva* sem considerar a fase estacionária do crescimento, nas condições testadas. Entretanto, o modelo de Baranyi e Roberts pode ser mais indicado para

este finalidade, pois a influência da temperatura sobre os parâmetros do modelo primário (modelos secundários) ficou mais evidente do que a apresentada pelos modelos de Fujikawa e Huang, em que esta tendência não foi observada.

Palavras-chave: microbiologia preditiva; modelagem matemática; crescimento de fungos; *Byssochlamys fulva*.

6.1 INTRODUÇÃO

Fungos resistentes ao calor são apontados como agentes deteriorantes em suco de frutas que passam por processamento térmico, como o suco de maçã, por exemplo, sendo que algumas espécies de fungos mais comumente isoladas são *Byssochlamys fulva* e *Neosartorya fischeri* (VALIK; PIECKOVA, 2001). Os fungos do gênero *Byssochlamys* são capazes de crescer sob baixas pressões parciais de oxigênio e em ambiente ácidos (TANIWAKI et al., 2009), sendo que estes fungos produzem ascósporos que podem sobreviver ao tratamento térmico aplicado aos sucos de frutas (PANAGOU et al., 2010).

A quantificação do crescimento de fungos filamentosos não é uma tarefa fácil porque estes não crescem como células únicas, mas como hifas filamentosas. Por isso, não podem ser quantificadas por técnicas de enumeração normalmente aplicada para quantificar bactérias e leveduras, como a contagem por plaqueamento, por exemplo (TANIWAKI et al., 2006).

A modelagem descritiva do crescimento de fungos filamentosos não tem recebido tanta atenção pelos pesquisadores de microbiologia preditiva quanto o crescimento bacteriano, provavelmente devido à complexidade e falta de bons métodos para quantificar o crescimento de fungos (GIBSON et al., 1994).

Um dos métodos comumente utilizados para quantificação do crescimento de fungos é a medida do diâmetro da colônia, a qual é expressa pelo crescimento da colônia de fungos (em milímetros) *versus* tempo. Este método tem sido muito utilizado para quantificar o crescimento de fungos (GIBSON et al., 1994; TASSOU et al., 2007; GOUGOULI; KOUTSOUMANIS, 2010).

Em consulta à literatura verificou-se que, em alguns trabalhos, a modelagem do crescimento das colônias de fungos foi realizada apenas para a fase exponencial, com a obtenção da inclinação da porção linear da curva (WYATT et al., 1995; GOUGOULI; KOUTSOUMANIS, 2010). Entretanto, modelos com funções contínuas são mais práticos

para avaliar o crescimento, uma vez que a estimativa dos parâmetros (velocidade de crescimento μ_{max} e fase de adaptação λ , por exemplo) pode ser feita para toda a curva de crescimento.

Um das primeiras tentativas de modelar o crescimento de fungos com o uso de modelos contínuos foi com o modelo de Baranyi e Roberts (GIBSON et al., 1994), sendo que este modelo foi originalmente desenvolvido para descrever o crescimento bacteriano (BARANYI et al., 1997). A partir disso, o modelo de Baranyi e Roberts tem sido usado em diversos trabalhos para modelar a curva de crescimento do diâmetro de colônias de fungos (VALIK; BARANYI; GORNER, 1999; TASSOU et al., 2007; SILVA; SANT'ANA; MASSAGUER, 2010). O modelo de Baranyi e Roberts foi utilizado com sucesso, por exemplo, para avaliar o crescimento do diâmetro de colônias de 14 diferentes espécies de fungos (MARIN et al., 2008).

O diâmetro atingido pelas colônias de fungos muitas vezes é elevado, ocupando todo o espaço que possuem para crescer. Nesses casos, não há como avaliar o diâmetro máximo atingido pelas colônias, e assim, modelos que não consideram a fase estacionária do crescimento devem ser usados. O diâmetro inicial das colônias de fungos muitas vezes é insignificante, ou de difícil quantificação. Nesses casos o parâmetro D_0 pode ser desconsiderado da equação (pois $D_0 \cong 0$). As considerações de modelagem descritas acima foram assumidas por alguns autores para a aplicação do modelo de Baranyi e Roberts (MARIN et al., 2008; MARIN et al., 2009) aos dados do crescimento do diâmetro de colônias de fungos.

Alguns modelos apresentados na literatura podem ser aptos a modelar o crescimento de microrganismos com as considerações acima descritas. O modelo de Huang (2008) tem um caso especial que considera a modelagem para o crescimento microbiano sem fase estacionária, o qual é apresentado na Equação (6.1).

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} \left[t + \left[\frac{1}{\alpha} \right] \ln \left(\frac{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])}{1 + \exp(\lambda\alpha)} \right) \right] \quad (6.1)$$

sendo que $y(t)$ é o logaritmo da contagem microbiana no tempo t , y_0 é o logaritmo da contagem microbiana inicial, e α é um parâmetro empírico de curvatura.

O modelo de Fujikawa (2010) é um modelo que foi desenvolvido para descrever o crescimento de bactérias em alimentos, de acordo com a Equação (6.2):

$$\frac{dy(t)}{dt} = r[1 - \exp(n[y_{min} - y(t)])][1 - \exp(m[y(t) - y_{max}])] \quad (6.2)$$

sendo que m e n são parâmetros empíricos de curvatura, e y_{min} e y_{max} são as assíntotas inferior e superior da curva de crescimento, respectivamente.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade dos modelos (i) Baranyi e Roberts, (ii) Huang e (iii) Fujikawa e selecionar aquele que descreve melhor o crescimento do diâmetro de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix, nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C, sem considerar a fase estacionária do crescimento.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Microrganismos e preparo da suspensão de esporos

A cepa de *B. fulva* IOC 4518 foi isolada do suco concentrado de maçã (SALOMÃO; MASSAGUER; ARAGÃO, 2008) no laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina. O preparo da suspensão de esporos de *B. fulva* iniciou-se pela pré-esporeção em placas de Petri contendo meio PDA (pH 3,5) por 7 dias a 30 °C. Os esporos coletados foram adicionados às placas de esporulação, contendo meio MEA e incubados por 30 dias a 30 °C. Após este período, adicionou-se 1 mL de água destilada estéril em cada placa e, depois da raspagem com espátula de borracha, todo o conteúdo foi filtrado em 4 camadas de gaze estéril e centrifugado a 3500 rpm (2000 x g) por 15 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes ou até a constatação microscópica da ausência de hifas. A suspensão final foi preparada com ressuspensão do precipitado em um volume de água mínimo, suficiente para se obter uma suspensão bastante concentrada (na ordem de 10^5 a 10^8 esporos/mL) (SALOMÃO; SLONGO; ARAGÃO, 2007). As suspensões de *B. fulva* foram transferidas para um frasco mantido a 4 °C até a utilização.

6.2.2 Quantificação da Suspensão de Esporos

Para a verificação do número de esporos nas suspensões, expresso em esporos/mL, foi feita, de forma asséptica, uma diluição das suspensões de esporos de *B. fulva* IOC 4518. Para este procedimento utilizaram-se tubos de diluição com rosca de 16x100 mm contendo 4,5 mL de água destilada estéril e 0,5 mL de cada suspensão de esporos.

Em seguida, estes tubos (diluição 10^{-1}) foram ativados em banho termostático (Tecnal-TE-184), ajustado previamente à temperatura de 80 °C, por 10 minutos (SALOMÃO, 2009). Transcorrido este tempo, os

tubos foram colocados imediatamente em banho de gelo. A ativação térmica teve por finalidade interromper o estado de dormência dos esporos pela aplicação do choque térmico.

Após a ativação foram feitas diluições seriais em ordem crescente (10^{-1} até 10^{-7}) em câmara de fluxo laminar, com o objetivo de quantificar os ascósporos ativados. A partir das diluições, foram realizados plaqueamentos por profundidade em meio PDA acrescido de solução de ácido tartárico 10% (m/v) até pH 3,5 e 1 mL/L de solução de rosa de bengala 5% (m/v), para evitar dispersão das colônias e inibir outras formas microbianas (BAGLIONI, 1998). As placas foram incubadas a 30°C, envolvidas por um filme plástico para evitar ressecamento. A leitura das placas para determinar o número de colônias formadas foi realizada no terceiro dia após o plaqueamento e confirmada no quinto dia. A contagem foi expressa em UFC/mL.

6.2.3 Meio de crescimento

O suco de maçã clarificado foi elaborado a partir do suco de maçã concentrado (70 °Brix) fornecido pela empresa de sucos Fischer S/A de Videira/SC. A correção do pH do suco foi realizada com soluções de hidróxido de sódio 1M ou ácido clorídrico 1M, conforme a necessidade, até atingir o pH de 3,8. Para o ajuste dos valores de concentração de sólidos solúveis e de a_w do suco, foram utilizados o suco concentrado ou água destilada. O teor de sólidos solúveis foi ajustado com o auxílio de um refratômetro (AR200 Reichert) e posteriormente foi realizada a medição da a_w no medidor de a_w modelo *Aqua Lab Models Series 3TE*. Após formulação do suco, adicionou-se 1,5 g de ágar para cada 100 mL de suco e as amostras foram pasteurizadas a 115°C/1 minuto (MIORELLI, 2009).

6.2.4 Avaliação do crescimento de *Byssochlamys fulva*

A avaliação do crescimento dos fungos *B. fulva* foi realizada utilizando os métodos de medida do crescimento do diâmetro nas colônias que cresceram na superfície do suco de maçã solidificado. Foram analisados os crescimentos em diferentes temperaturas de incubação (10, 15, 20, 25 e 30 °C).

As análises foram realizadas em duplicata, em placas de Petri de 150x15 mm preenchidas com suco de maçã + ágar com teor de sólidos solúveis de 25 °Brix, previamente pasteurizadas a 115 °C/1 minuto. As placas contendo o suco solidificado foram individualmente inoculadas

em câmara de fluxo laminar depositando-se uma alçada da suspensão de micro-organismos no centro de cada placa. Posteriormente, as placas foram incubadas a 10, 15, 20, 25 e 30 °C, envoltas por filme plástico, por 3 meses ou até que o crescimento atingisse toda a placa.

As culturas foram consideradas sem crescimento quando as alterações visíveis para o inóculo não ocorreram depois de 90 dias.

6.2.5 Medida do diâmetro da colônia

Os lados reversos das colônias foram medidos em milímetros, com uma régua. Os dados experimentais foram obtidos pela média de medições em quatro colônias, em quatro posições diferentes da placa. O diâmetro das colônias foi acompanhado por medição a cada 12 horas. O crescimento do diâmetro da colônia foi considerado como crescimento do fungo, sendo as curvas de crescimento expressas pela variação do diâmetro da colônia (mm) em função do tempo (h). O plaqueamento do suco de maçã com ágar foi realizado sem inoculação, corrigido para 25 °Brix a cada temperatura, para comprovar que o meio estava livre de contaminação.

6.2.6 Modelagem matemática

Dentre os diversos modelos disponíveis na literatura, foram escolhidos neste estudo os modelos de (i) Baranyi e Roberts, (ii) Huang e (iii) Fujikawa para descrever o crescimento do diâmetro das colônias de fungos.

As equações diferenciais (6.3) e (6.4) compõem o modelo de Baranyi e Roberts, sendo que a Equação (6.3) foi reduzida da função de inibição (que descreve a fase estacionária do crescimento). Este modelo é chamado de modelo de Baranyi e Roberts reduzido (BAR-R):

$$\frac{dD(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{q(t)}{q(t) + 1} \right] \quad (6.3)$$

$$\frac{dq(t)}{dt} = \mu_{max} q(t) \quad (6.4)$$

sendo que $D(t)$ é o diâmetro da colônia, $q(t)$ é o estado fisiológico das células, e μ_{max} é a velocidade máxima específica do crescimento do diâmetro com o tempo (mm/h^{-1}). As condições iniciais das equações diferenciais são $D(0) = 0$ e $q(0) = q_0$. As equações podem ser

resolvidas analiticamente para condições ambientais constantes, o que gera a Equação (6.5):

$$D(t) = \ln(1 + \exp(\mu_{max}[t - \lambda]) - \exp(-\mu_{max}\lambda)) \quad (6.5)$$

sendo que q_0 é substituído na equação por λ , que é obtido através da Equação (6.6).

$$\lambda = \left[\frac{1}{\mu_{max}} \right] \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (6.6)$$

O modelo de Huang, apresentado na Equação (6.1), foi adaptado através da substituição da variável dependente $y(t)$ pela variação do diâmetro $D(t)$, e o parâmetro y_0 foi desconsiderado da equação. O modelo de Huang é chamado de modelo de Huang reduzido (HUA-R), o qual é apresentado na Equação (6.7):

$$D(t) = \mu_{max} \left[t + \left[\frac{1}{\alpha} \right] \ln \left(\frac{1 + \exp(\alpha[\lambda - t])}{1 + \exp(\alpha\lambda)} \right) \right] \quad (6.7)$$

No modelo de Fujikawa, apresentado na Equação (6.2), o parâmetro $y(t)$ foi substituído por $D(t)$. Este modelo é chamado de modelo de Fujikawa reduzido (FUJ-R), sendo que este é apresentado na Equação (6.8).

$$\frac{dD(t)}{dt} = \mu_{max} [1 - \exp(n[D_{min} - D(t)])] \quad (6.8)$$

Para condições ambientais constantes, a Equação (6.8) pode ser revolvida analiticamente, a qual gera a Equação (6.9).

$$D(t) = D_{min} + \left[\frac{1}{n} \right] \ln(1 + \exp(n\mu_{max}t) - \exp(n[\mu_{max}t + D_{min}])) \quad (6.9)$$

sendo que D_{min} é assíntota inferior da curva, com valor fixo em 10^{-6} mm.

O modelo secundário da raiz quadrada de Ratkowsky et al. (1982) é muito utilizado para modelar o efeito da temperatura sobre os parâmetros dos modelos primários (BARANYI et al., 1995; XANTHIAKOS et al., 2006; LEE et al., 2007; GOSPAVIC et al., 2008). O modelo da raiz quadrada é apresentado na Equação (6.10), sendo que T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), T_{min} é a temperatura teórica de mínimo crescimento microbiano ($^{\circ}\text{C}$), b é um parâmetro empírico do modelo ($^{\circ}\text{C}^{-1}\text{h}^{-0.5}$) e p é o parâmetro modelado em função da temperatura ($\text{h}^{-0.5}$), sendo substituído por μ_{max} e $(1/\lambda)$, onde os parâmetros b e T_{min} são estimados através de ajuste.

$$\sqrt{p} = b(T - T_{min}) \quad (6.10)$$

6.2.7 Análises estatísticas

A capacidade dos modelos de representar os dados experimentais nas diferentes temperaturas foi avaliada através da raiz do erro médio quadrático (*RMSE*) e do coeficiente de determinação ajustado (R_{aj}^2). O *RMSE* foi calculado conforme a Equação (6.11), onde pd_i são os valores preditos pelo modelo, ob_i são os valores observados nos experimentos, *num* é o número de pontos experimentais, e *var* é o número de variáveis significativas do modelo avaliado.

$$RMSE = \left[\frac{1}{num - var} \right] \sqrt{\sum_{i=1}^n (pd_i - ob_i)^2} \quad (6.11)$$

O R^2 -ajustado é baseado no coeficiente de correlação de Pearson (SOPER et al., 1917) elevado ao quadrado, no número de pontos experimentais e variáveis significativas, sendo calculado conforme a Equação (6.12).

$$R_{aj}^2 = 1 - \left[\frac{(num - 1)}{num - var + 1} \right] \left[1 - \frac{(\sum (pd_i - \bar{pd})(ob_i - \bar{ob}))^2}{\sum (pd_i - \bar{pd})^2 \sum (ob_i - \bar{ob})^2} \right] \quad (6.12)$$

Considera-se que bons ajustes são obtidos quando valores de *RMSE* são mais próximos de zero, e valores de R_{aj}^2 são mais próximos de um.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

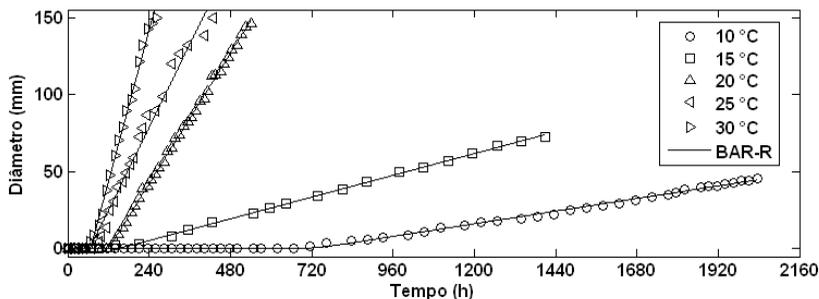
Os valores de *RMSE* resultantes dos ajustes dos modelos BAR-R, FUJ-R e HUA-R aos dados experimentais do crescimento do diâmetro de colônias de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix, nas diferentes temperaturas, são apresentados na Tabela 6.1. Os modelos reduzidos apresentaram uma boa capacidade em descrever os dados experimentais, com a obtenção de baixos valores de *RMSE*, como pode ser visto na referida tabela. Os valores de *RMSE* maiores para as temperaturas de 25 °C e 30 °C podem ser explicados pelo maior crescimento do microrganismo nessas temperaturas, e por leves variações no crescimento. De qualquer forma, os modelos foram capazes de

descrever a tendência de crescimento do diâmetro de *B. fulva* com o tempo, como pode ser visto na Figura 6.1, onde são apresentados os ajustes do modelo BAR-R aos dados experimentais.

Tabela 6.1 – Valores de *RMSE* resultantes dos ajustes dos modelos BAR-R, FUJ-R e HUA-R aos dados do crescimento do diâmetro de colônias de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.

Modelo	Temperatura				
	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
BAR-R	0.803	0.841	1.361	6.748	3.793
FUJ-R	0.781	0.912	1.460	7.086	3.922
HUA-R	0.703	0.807	1.371	6.905	3.800

Figura 6.1 – Ajuste do modelo BAR-R aos dados do crescimento do diâmetro de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.

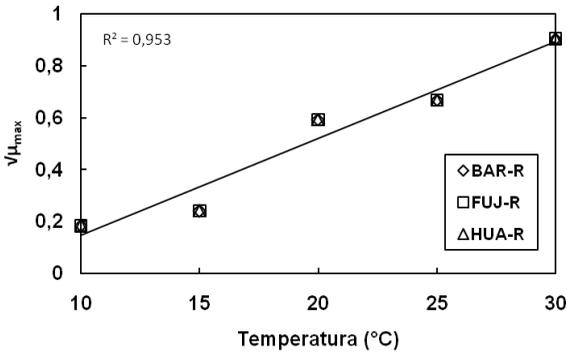


Os parâmetros estimados pelos ajustes dos modelos aos dados são apresentados na Tabela 6.2. É possível inferir que as estimativas do parâmetro μ_{max} pelos três modelos apresentaram grande similaridade. Na Figura 6.2, apresenta-se os dados das estimativas do parâmetro μ_{max} pelos três modelos, onde foi possível verificar que há uma tendência de dependência linear entre a raiz quadrada do parâmetro e a temperatura (modelo secundário da raiz quadrada), com boa correlação (R^2 igual a 0,953). Para o parâmetro λ dos modelos BAR-R e HUA-R também foi possível verificar que há uma tendência de dependência linear entre o inverso da raiz quadrada do parâmetro e a temperatura, com boa correlação (R^2 igual a 0,885), como pode ser visto na Figura 6.3.

Tabela 6.2 – Estimativas dos parâmetros dos modelos BAR-R, FKM-R e HUA-R obtidas pelos ajustes aos dados do crescimento do diâmetro de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.

Modelo	Parâmetro	Temperatura				
		10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
BAR-R	μ_{max}	0,0341	0,0587	0,3525	0,4483	0,8181
	λ	723,89	149,36	120,24	64,40	67,28
FUJ-R	μ_{max}	0,0344	0,0588	0,3527	0,4482	0,8209
	n	0,572	1,516	0,350	0,503	0,272
HUA-R	μ_{max}	0,0355	0,0589	0,3525	0,4484	0,8228
	λ	763,90	150,89	120,30	64,45	68,06
	α	0,0088	0,0253	4,5535	9,2933	0,1554

Figura 6.2 – Estimativas do parâmetro μ_{max} pelos os modelos BAR-R, FUJ-R e HUA-R para os dados do crescimento de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C, e ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados.



Os parâmetros empíricos c do modelo FUJ-R e α do modelo HUA-R, por sua vez, não apresentaram uma tendência clara com a temperatura, como pode ser visto na Figura 6.4. Assim, é difícil encontrar um modelo que seja capaz de descrever bem a dependência destes parâmetros com a temperatura.

Figura 6.3 – Estimativas do parâmetro λ pelos os modelos BAR R e HUA R para os dados do crescimento de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °, e ajuste do modelo secundário da raiz quadrada aos dados.

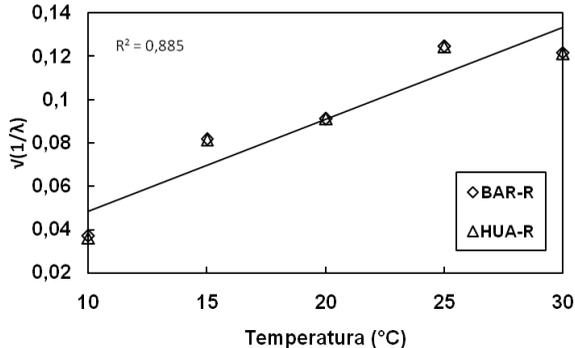
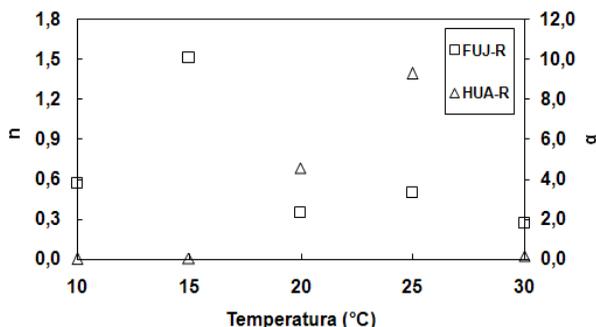


Figura 6.4 – Estimativas dos parâmetros n (FUJ-R) e α (HUA-R) para os dados do crescimento de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.



6.4 CONCLUSÃO

Os modelos avaliados no estudo (Baranyi e Roberts, Huang e Fujikawa) apresentaram uma boa capacidade em descrever o crescimento do diâmetro de *B. fulva* em suco de maçã a 25 °Brix nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C, sem considerar a fase estacionária do crescimento.

A partir dos resultados obtidos, pode-se considerar que o modelo de Baranyi e Roberts seja mais indicado para descrever o crescimento de

B. fulva nas condições apresentadas no estudo. A dependência entre os parâmetros μ_{max} e λ do modelo de Baranyi e Roberts com a temperatura foi possível ser descrita através de modelos secundários, enquanto para os parâmetros empíricos n e α dos modelos FUJ-R e HUA-R, não foi possível encontrar uma boa dependência com a temperatura.

7 APÊNDICE B – Obtenção dos parâmetros com significado biológico: velocidade máxima específica de crescimento e duração da fase lag de modelos com parâmetros empíricos

Este capítulo foi elaborado como material de apoio ao trabalho principal, com o objetivo de apresentar uma análise dos diferentes parâmetros dos modelos matemáticos.

RESUMO

Em microbiologia preditiva considera-se que os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e duração da fase lag (λ) possuem significado biológico. Esses parâmetros são utilizados com frequência para caracterizar o crescimento de diversos microrganismos em condições ambientais específicas, pois podem ser validados com maior facilidade pelos microbiologistas. Um número considerável de modelos com formato sigmoidal, com parâmetros empíricos, é usado na literatura para descrever o crescimento microbiano. Como exemplos têm-se os modelos Genérico (GEN) e Logístico modificado (LCP) de Corradini e Peleg, sendo que os parâmetros empíricos podem ser transformados nos parâmetros com significado biológico μ_{max} e λ através de expressões matemáticas. Neste estudo foram obtidas as transformações matemáticas dos parâmetros empíricos dos modelos LCP e GEN para os parâmetros μ_{max} e λ , com base na metodologia de Zwietering e colaboradores. Além disso, foi realizada a comparação entre os parâmetros μ_{max} e λ obtidos por diferentes modelos sigmoidais para dados do crescimento de *L. plantarum* em meio MRS em seis temperaturas (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C). Os resultados mostraram que foi possível obter, através de transformações matemáticas, os parâmetros com significado biológicos a partir de parâmetros empíricos. Algumas das vantagens de se obter parâmetros com significado biológico são: a possibilidade de comparação entre parâmetros de diferentes modelos sigmoidais, e a probabilidade maior de encontrar uma função que descreva bem a dependência dos parâmetros com a temperatura.

Palavras-chave: microbiologia preditiva; modelos matemáticos; parâmetros biológicos; parâmetros empíricos.

7.1 INTRODUÇÃO

Em microbiologia preditiva, considera-se que os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e duração da fase *lag* (λ) possuem significado biológico. Desde que o logaritmo da contagem microbiana seja usado, o parâmetro μ_{max} é definido como a inclinação da reta tangente ao ponto de maior inclinação da curva do crescimento microbiano, enquanto o parâmetro λ é definido como a interceptação desta reta tangente com o valor da contagem microbiana inicial (PIRT, 1975; ZWIETERING et al., 1990).

Estes parâmetros são utilizados com frequência para caracterizar o crescimento de diversos microrganismos em condições ambientais específicas (ZWIETERING et al., 1994; BARANYI et al., 1995; HUANG, 2011). Outros importantes parâmetros na curva de crescimento microbiano são a população inicial (y_0), a população máxima atingida (y_{max}) e a amplitude da curva de crescimento (A).

Na literatura é possível encontrar um número considerável de modelos com formato sigmoidal com parâmetros empíricos, os quais podem ser utilizados para avaliar o crescimento de populações (TSOULARIS; WALLACE, 2002). Por exemplo, Corradini e Peleg (2005) utilizaram modelos sigmoidais com parâmetros empíricos, chamados de Logístico modificado por Corradini e Peleg – LCP (Equação (7.1)) e Genérico de Corradini e Peleg – GEN (Equação (7.2)), para descrever matematicamente o crescimento microbiano.

$$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp(k[t_{ifx} - t])} - \frac{A}{1 + \exp(kt_{ifx})} \quad (7.1)$$

$$Y(t) = \frac{At^n}{b + t^n} \quad (7.2)$$

Nas Equações (7.1) e (7.2), $Y(t)$ é a razão logarítmica natural entre a contagem microbiana no tempo t e a contagem microbiana inicial ($Y(t) = \ln(N(t)/N_0$)), e a , b , k , n e t_{ifx} são parâmetros empíricos dos modelos.

De acordo com Baty e Delignette-Muller (2004), modelos matemáticos que possuem parâmetros com significado biológico podem ser considerados mais interessantes em termos práticos, pois a estimativa dos parâmetros de crescimento pode ser avaliada de forma mais conveniente; além disso, modelos que possuem parâmetros com significado biológico são preferidos porque podem ser validados com maior facilidade pelos microbiologistas.

Neste contexto, Zwietering et al. (1990) reparametrizaram cinco modelos de crescimento microbiano que possuem parâmetros empíricos (Gompertz, Logístico, Richards, Stannard e Schnute) com os parâmetros com significado biológico aceitos pela comunidade acadêmica, ou seja, μ_{max} e λ . A partir desta publicação, o modelo Logístico modificado por Zwietering e colaboradores – LMZ, Equação (7.3) e o modelo de Gompertz modificado por Zwietering e colaboradores – GOM, Equação (7.4) foram utilizados por diversos autores na forma modificada (ZWIETERING et al., 1994; PAL; LABUZA; DIEZ-GONZALEZ, 2008; SLOGO et al., 2009).

$$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp\left[\frac{4\mu_{max}}{A}(\lambda - t) + 1\right]} \quad (7.3)$$

$$Y(t) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\exp(1)\mu_{max}}{A}(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad (7.4)$$

O rearranjo de parâmetros em um modelo, porém, pode modificar a exatidão da estimativa dos parâmetros, tornando o ajuste do modelo diferente do original (ZWIETERING; DEN BESTEN, 2011).

A obtenção dos parâmetros com significado biológico a partir de parâmetros empíricos é feita com o uso de expressões matemáticas capazes de transformar um parâmetro em outro.

O objetivo deste estudo foi encontrar as transformações matemáticas dos parâmetros empíricos dos modelos sigmoidais LCP e GEN para os parâmetros com significado biológico μ_{max} e λ , e comparar as estimativas destes parâmetros entre os modelos sigmoidais LCP, GEN, LMZ e GOM utilizando dados do crescimento de *L. plantarum* em meio MRS.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A bactéria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* (CCT 0580 ATCC 8014, Lote 07.05) foi adquirida na forma liofilizada da coleção de culturas da Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, Brasil). As cepas foram reidratadas conforme indicação, cultivadas em meio Man, Rugosa e Sharpe (MRS) – *Lactobacillus* (Acumedia Manufactures, Inc. Lansing, Michigan, USA) e estocadas em tubos *ependorf* com meio MRS contendo 20% de glicerol a -24 °C até a utilização.

7.2.2 Condições de crescimento

A reativação da cultura para o preparo dos inóculos foi realizada em meio MRS a 30 °C por 18 horas. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 160 mL de meio MRS e 1% (v/v) de inóculo. Os frascos foram incubados em estufa (Dist, Florianópolis, Brasil) em diferentes condições isotérmicas: temperaturas de refrigeração (4 e 8 °C), temperaturas de estocagem abusivas (12, 16 e 20 °C) e temperatura ótima de crescimento (30 °C). Todos os experimentos isotérmicos foram feitos em duplicata, em dias diferentes.

7.2.3 Amostragem

Amostras de 2 mL foram coletadas assepticamente em câmara de fluxo laminar (CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil) em intervalos de tempo pré-estabelecidos, e medidas da absorbância em espectrofotômetro (1105, Bel Photonics, Monza, Itália) foram realizadas em comprimento de onda de 600 nm, em cubetas de vidro. O branco utilizado foi água destilada, descontado das medidas de absorbância das suspensões. A faixa de absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8, sendo efetuadas diluições a partir deste valor para manter a linearidade. Os dados de absorbância foram transformados em contagem de colônias através da utilização de curvas de calibração obtidas previamente em laboratório, com alto coeficiente de determinação ($R^2 > 0,98$).

7.2.4 Modelos matemáticos

Os modelos LCP (Equação (7.1)), GEN (Equação (7.2)), LMZ (Equação (7.3)) e GOM (Equação (7.4)) foram ajustados aos dados experimentais do crescimento de *L. plantarum* nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

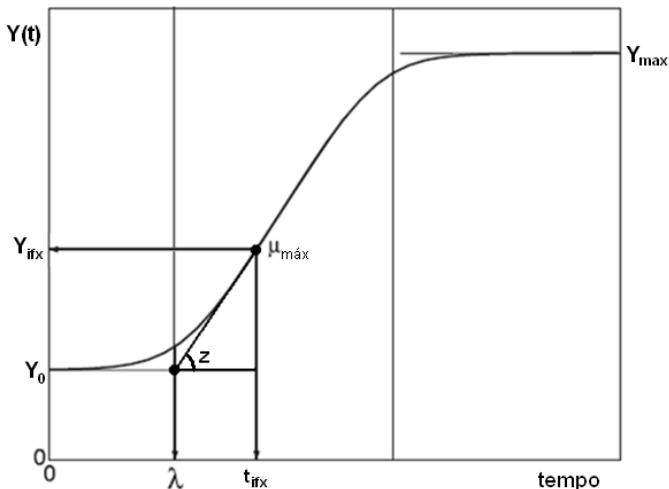
As estimativas dos parâmetros μ_{max} e λ dos modelos LMZ e GOM foram obtidas diretamente do ajuste destes modelos aos dados experimentais.

Para os modelos LCP e GEN, a estimativa dos parâmetros empíricos a , b , k , n e t_{ifx} foram realizadas a partir do ajuste destes modelos aos dados experimentais, sendo que as estimativas dos parâmetros μ_{max} e λ foram obtidas através da metodologia que será descrita a seguir.

7.2.5 Metodologia de obtenção dos parâmetros μ_{max} e λ

A metodologia para obtenção dos parâmetros μ_{max} e λ a partir dos parâmetros empíricos dos modelos GEN e LCP é baseada na metodologia de Zwietering et al. (1990). A Figura 7.1 apresenta os parâmetros μ_{max} e λ na curva sigmoidal, e indica o ponto de inflexão no eixo do tempo (t_{ifx}) e do logaritmo da contagem (Y_{ifx}).

Figura 7.1 – Curva com formato sigmoidal, típica do crescimento microbiano, contendo a representação gráfica dos parâmetros com significado biológico μ_{max} e λ , e indicação do ponto de inflexão no eixo do tempo (t_{ifx}) e do logaritmo da contagem (Y_{ifx}).



As funções sigmoidais que descrevem o crescimento microbiano possuem um ponto de inflexão, sendo que a expressão matemática para o tempo no ponto de inflexão (t_{ifx}) pode ser obtida através da segunda derivada da função sigmoidal igualada à zero ($d^2Y(t)/dt^2 = 0$). A substituição da expressão matemática de t_{ifx} na primeira derivada da função ($Y(t)$) fornece a expressão para μ_{max} , como apresentado na Equação (7.5).

$$\frac{dY(t_{ifx})}{dt} = \mu_{max} \quad (7.5)$$

A partir das definições dos parâmetros μ_{max} e λ apresentados na introdução é possível obter a Equação (7.6). Y_{ifx} é a expressão para a

função $Y(t)$ no ponto de inflexão, sendo que esta expressão pode ser obtida ao aplicar o valor de t_{ifx} na função $Y(t)$, ou seja, $Y(t_{ifx}) = Y_{ifx}$.

$$\tan(z) = \frac{Y_{ifx} - Y_0}{t_{ifx} - \lambda} = \mu_{max} \quad (7.6)$$

O parâmetro λ pode ser isolado da Equação (7.6), obtendo-se a Equação (7.7).

$$\lambda = t_{ifx} - \frac{Y_{ifx} - Y_0}{\mu_{max}} \quad (7.7)$$

Com o valor dos parâmetros empíricos dos modelos sigmoidais (A , b e n para o modelo GEN; e A , k e t_{ifx} para o modelo LCP), é possível obter o valor dos parâmetros μ_{max} e λ a partir das expressões resultantes.

7.2.6 Análises numéricas

Rotinas computacionais foram programadas e executadas no *software* Matlab para cada um dos modelos, usando *m files*. Os ajustes dos modelos aos dados experimentais foram realizados através da função *fit* da ferramenta *curve fitting tool* do Matlab, com a utilização do método dos mínimos quadrados não linear e do algoritmo *trust region reflective Newton*. O valor para a tentativa inicial de cada parâmetro foi selecionado a partir da observação das curvas experimentais.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Obtenção dos parâmetros μ_{max} e λ para os modelos GEN e LCP

Na Tabela 7.1 são apresentadas as expressões matemáticas para o tempo no ponto de inflexão (t_{ifx}) e a contagem no ponto de inflexão (Y_{ifx}) obtidas para os modelos GEN e LCP. Com as expressões de t_{ifx} e Y_{ifx} aplicadas nas Equações (7.6) e (7.7) foram encontradas as expressões para μ_{max} e λ para estes dois modelos, sendo que estas estão na mesma tabela.

Tabela 7.1 – Expressões matemáticas para o tempo no ponto de inflexão (t_{ifx}), razão logarítmica da contagem no ponto de inflexão (Y_{ifx}), velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) e duração da fase *lag* (λ) para os modelos Genérico (GEN) e Logístico modificado por Corradini e Peleg (LCP).

GEN		LCP	
$t_{ifx} = \sqrt[n]{\frac{b(n-1)}{(n+1)}}$	(7.8)	$t_{ifx} = t_{ifx}$	(7.9)
$Y_{ifx} = \frac{a(n-1)}{2n}$	(7.10)	$Y_{ifx} = \frac{a}{2} - \frac{a}{1 + \exp(kt_{ifx})}$	(7.11)
$\mu_{max} = \frac{a(n-1)^{\frac{(n-1)}{n}}(n+1)^{\frac{(n+1)}{n}}}{4n\sqrt[n]{b}}$	(7.12)	$\mu_{max} = \frac{ka}{4}$	(7.13)
$\lambda = \sqrt[n]{b} \left(\frac{n-1}{n+1} \right)^{\frac{(n+1)}{n}}$	(7.14)	$\lambda = t_{ifx} - \frac{1}{k} \left(2 - \frac{4}{1 + \exp(kt_{ifx})} \right)$	(7.15)

7.3.2 Comparações entre os parâmetros biológicos dos modelos LCP, GEN, LMZ e GOM

Na Tabela 7.2 são apresentados os valores dos parâmetros A , b e n do modelo GEN e dos parâmetros A , k e t_{ifx} do modelo LCP estimados no ajuste aos dados do crescimento de *L. plantarum* a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

Tabela 7.2 – Parâmetros estimados pelos ajustes dos modelos GEN e LCP aos dados do crescimento de *L. plantarum* a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

Modelo	Parâmetro	Temperatura					
		4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	30 °C
GEN	A	1,41	1,77	2,00	1,96	2,17	2,33
	b	7360	169000	20500	7220	542	84,1
	n	1,57	2,80	2,87	3,11	2,73	2,74
LCP	A	1,20	1,76	2,05	1,96	2,28	2,39
	k	0,0097	0,0388	0,0892	0,1801	0,2516	0,5403
	t_{ifx}	162,07	70,58	31,14	16,96	9,52	4,86

Na Tabela 7.3 e na Tabela 7.4 apresentamos os valores dos parâmetros μ_{max} e λ estimados pelo ajuste dos modelos LMZ e GOM, assim como os valores destes parâmetros calculados para os modelos GEN e LCP através das Equações (7.3) e (7.4), para os dados do crescimento de *L. plantarum* a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

Tabela 7.3 – Valores da velocidade específica de crescimento (μ_{max}) de *L. plantarum* a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C estimadas pelos modelos LMZ, GOM, GEN e LCP.

Modelo	Temperatura					
	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	30 °C
LMZ	0.0033	0.0182	0.0506	0.0920	0.1567	0.3504
GOM	0.0030	0.0178	0.0483	0.0901	0.1552	0.3341
LCP	0.0029	0.0171	0.0457	0.0882	0.1434	0.3228
GEN	0.0030	0.0189	0.0513	0.0975	0.1694	0.3636

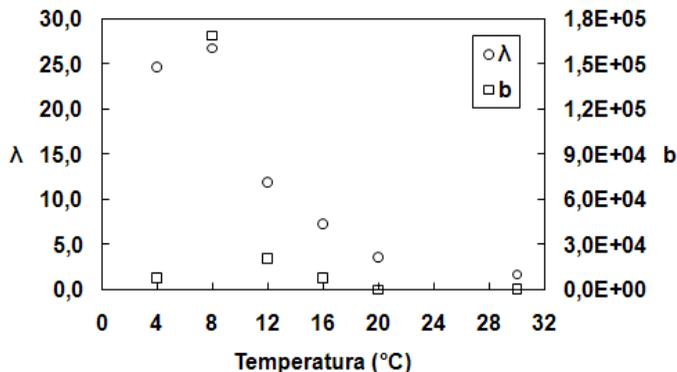
Tabela 7.4 – Valores da duração da fase *lag* (λ) de *L. plantarum* a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C estimadas pelos modelos LMZ, GOM, GEN e LCP.

Modelo	Temperatura					
	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	30 °C
LMZ	48.76	29.22	13.75	7.47	3.71	2.01
GOM	31.58	25.36	11.49	6.57	3.22	1.63
LCP	26.78	25.30	11.34	6.86	2.90	1.66
GEN	24.60	26.87	11.90	7.21	3.51	1.77

Os parâmetros empíricos dos modelos GEN e LCP (Tabela 7.2) não podem ser comparados de forma direta, pois não apresentam significado físico. Por sua vez, os parâmetros com significado biológico μ_{max} e λ estimados para os modelos LMZ, GOM, LCP e GEN, apresentados na Tabela 7.3 e na Tabela 7.4, podem ser comparados.

São apresentados na Figura 7.2 os dados das estimativas do parâmetro empírico b e do parâmetro λ para o modelo GEN. É possível verificar que o parâmetro λ segue uma tendência de decréscimo não-linear com a temperatura, enquanto que o parâmetro b não apresenta uma tendência clara com a temperatura.

Figura 7.2 – Influência da variação da temperatura sobre o parâmetro empírico b e o parâmetro com significado biológico λ para o modelo GEN.



É possível destacar outras vantagens importantes, além das vantagens de se usar os parâmetros com significado biológico citadas na introdução por Baty e Delignette-Muller (2004):

- A possibilidade de comparação entre parâmetros de diferentes modelos sigmoidais;
- A probabilidade maior de encontrar uma função que descreva bem a dependência dos parâmetros com a temperatura.

7.4 CONCLUSÕES

As transformações matemáticas dos parâmetros empíricos para os parâmetros com significado biológico μ_{max} e λ para os modelos GEN e LCP foi possível a partir das definições dos parâmetros e da metodologia proposta por Zwietering et al. (1990).

Algumas das vantagens de se obter parâmetros com significado biológico são: a possibilidade de comparação entre parâmetros de diferentes modelos sigmoidais, e a probabilidade maior de encontrar uma função que descreva bem a dependência dos parâmetros com a temperatura.

8 APÊNDICE C – EQUIVALÊNCIA DE MODELOS

Alguns modelos de crescimento microbiano possuem uma similaridade muito grande em suas estruturas, como discutido na classificação dos modelos, no capítulo de revisão bibliográfica.

O modelo de Huang, que é apresentado na Equação (8.1), e o modelo de Baranyi e Roberts, que é apresentado nas Equações (8.2) e (8.3), possuem estrutura muito parecidas. Uma análise comparativa entre estes modelos foi realizada porque determinadas considerações sobre os parâmetros dos modelos produzem estruturas matemáticas equivalentes.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{1}{1 + \exp(-\alpha[t - \lambda])} \right] [1 - \exp(y(t) - y_{max})] \quad (8.1)$$

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{max} \left[\frac{1}{1 + e^{-q(t)}} \right] [1 - \exp(y(t) - y_{max})] \quad (8.2)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{max} \quad (8.3)$$

O modelo de Huang é composto por cinco parâmetros (α , μ_{max} , λ , y_{max} e y_0), enquanto o modelo de Baranyi e Roberts é composto por quatro parâmetros (μ_{max} , q_0 , y_{max} e y_0). É possível identificar que o modelo de Huang tem o parâmetro extra α na função de ajuste em relação ao modelo de Baranyi e Roberts, levando em conta que o parâmetro q_0 do modelo de Baranyi e Roberts pode ser transformado no parâmetro λ . Como teste, foi feito no modelo de Huang a substituição do parâmetro α pelo parâmetro μ_{max} , e no modelo de Baranyi e Roberts, foi feita a transformação do parâmetro q_0 para o parâmetro λ através da Equação (8.4).

$$\lambda = \left[\frac{1}{\mu_{max}} \right] \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (8.4)$$

A função de ajuste resultante os dois modelos foi equivalente, que é apresentada na Equação (8.5).

$$\mu_{lag} = \frac{1}{1 + \exp(\mu_{max}[\lambda - t])} \quad (8.5)$$

Portanto, a substituição do parâmetro α pelo parâmetro μ_{max} no modelo de Huang produz uma expressão matemática equivalente ao modelo de Baranyi e Roberts.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEE, W. C. **Animal aggregations - a study in general sociology.** Chicago:1931.

BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente.** 1998. (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BARANYI, J. et al. Predictive models as means of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species. **Food Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 347-351, 1997.

_____. Predicting growth of *brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 61-75, 1995.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 277-294, 1994.

_____. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 199-218, 1995.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.; McCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiology**, v. 10, p. 43-59, 1993.

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 261-277, 2004.

BERNAERTS, K. et al. Modeling Microbial Dinamics under Time-Varying Conditions. In: (Ed.). **Modelling microbial responses in food.** Washington D.C.: CRC Press, 2004. p.255-273.

BLUMBERG, A. A. Logistic growth rate functions. **J. Theor. Biol.**, n. 21, p. 42, 1968.

BORCH, E.; KANTMUERMANS, M.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 103-120, 1996.

BOVILL, R. et al. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 157-165, 2000.

BUCHANAN, R. L., CYGNAROWICZ, M.L. A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. **Food Microbiology**, v. 7, p. 237–240, 1990.

CAYRE, M.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 561-566, 2003.

CORRADINI, M.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 187-200, 2005.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. Florianópolis, p.190. 2010.

DAVEY, K. Applicability of the davey (linear arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial-growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 253-257, 1991.

ESTY, J. R.; MEYER, K. F. The heat resistance of the spore of *B. botulinum* and allied anaerobes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p.650-663, 1922.

FU, B.; LABUZA, T. P. Considerations for the Application of Time-Temperature Integrators in Food Distribution. **Journal of Food Distribution Research**, v. 23, p. 9-18, 1992.

FU, B.; TAOUKIS, P.; LABUZA, T. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy-products with time-temperature integrators. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1209-1215, 1991.

FUJIKAWA, H. Development of a New Logistic Model for Microbial Growth in Foods. **Biocontrol Science**, v. 15, n. 3, p. 75-80, 2010.

FUJIKAWA, H.; KAI, A.; MOROZUMI, S. A new logistic model for Escherichia coli growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 501-509, 2004.

GARCIA-GIMENO, R.; HERVAS-MARTINEZ, C.; DE SILONIZ, M. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 19-30, 2002.

GIBSON, A. et al. Predicting fungal growth - the effect of water activity on aspergillus-flavus and related species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3-4, p. 419-431, 1994.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of Clostridium botulinum type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 479-490, 1987.

GOMPERTZ, B. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode determining the value of life contingencies. **Trans. R. Soc. London**, n. 115, p. 513-585, 1825.

GOSPAVIC, R. et al. Mathematical modelling for predicting the growth of Pseudomonas spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 290-297, 2008.

GOUGOULI, M.; KOUTSOUMANIS, K. Modelling growth of Penicillium expansum and Aspergillus niger at constant and fluctuating temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2-3, p. 254-262, 2010.

HILLS, B.; WRIGHT, K. A new model for bacterial-growth in heterogeneous systems. **Journal of Theoretical Biology**, v. 168, n. 1, p. 31-41, 1994.

HUANG, L. Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. **Food Microbiology**, v. 20, p. 549-559, 2003.

_____. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters - Determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 235-242, 2008.

_____. A new mechanistic growth model for simultaneous determination of lag phase duration and exponential growth rate and a new Belehradek-type model for evaluating the effect of temperature on growth rate. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 770-776, 2011.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, p. 139-150, 1998.

HUTCHINSON, G. E. Circular casual systems in ecology. **Annals of the New York Academy of Sciences**. n. 50, p. 211-246, 1948.

JUNEJA, V. et al. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured meat and poultry. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 791-795, 2011.

_____. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. **Food Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 328-335, 2007.

KOUTSOUMANIS, K. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1821-1829, 2001.

KREYENSCHMIDT, J. et al. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 510-520, 2010.

LEE, D. et al. Model on the microbial quality change of seasoned soybean sprouts for on-line shelf life prediction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 285-293, 2007.

MAFART, P. Food engineering and predictive to combine biological microbiology: on the necessity and physical kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 239-251, 2005.

MALTHUS, T. R. **An Essay on the Principle of Population**. Harmondsworth, England: 1798.

MARIN, S. et al. Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 491-496, 2009.

_____. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 139-149, 2008.

McDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 1-27, 1999.

McMEEKIN, T. A.; MELLEFONT, L. A.; ROSS, T. Predictive Microbiology: past, present and future. In: BRUL, S.; VAN GERWEN, S., *et al* (Ed.). **Modelling Microorganisms in Food**. Boca Raton Boston New York Washington, DC: CRC Press, 2007. cap. 2, p.7-21.

McMEEKIN, T. A. et al. **Predictive Microbiology: Theory and Application**. Taunton, U.K.: Research Studies Press Ltd., 1993.

_____. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 395-407, 2002.

McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 133-153, 2002.

MESSENS, W. et al. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 41-52, 2003.

MEYER, P.; AUSUBEL, J. Carrying capacity: A model with logistically varying limits. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 61, n. 3, p. 209-214, 1999.

MIORELLI, S. **Determinação dos parâmetros de resistência térmica de micro-organismos contaminantes de alimentos ácidos**. 2009. (Mestrado). Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

NYCHAS, G. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, 2008.

PAL, A.; LABUZA, T.; DIEZ-GONZALEZ, F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 460-470, 2008.

PANAGO, E. et al. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 618-627, 2010.

PELEG, M.; CORRADINI, M.; NORMAND, M. The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. **Food Research International**, v. 40, n. 7, p. 808-818, 2007.

PIRT, S. J. **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. Oxford: Blackwell, 1975.

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

_____. Relationship between temperature and growth-rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1-5, 1982.

RICHARDS, F. A flexible growth function for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, v. 10, n. 29, p. 290-300, 1959.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501-508, 1996.

SALOMÃO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes do processo produtivo de néctar de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 28, p. 116-121, 2008.

SALOMAO, B. C. M.; SLONGO, A.; ARAGAO, G. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 676-680, 2007.

_____. **Deteção de patulina e desinfecção de maçãs destinadas à produção de suco**. 2009. (Doutorado). Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 degrees C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329-340, 2000.

SILVA, A.; SANT'ANA, A.; MASSAGUER, P. Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus section Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 1105-1116, 2010.

SKINNER, G.; LARKIN, J.; RHODEHAMEL, E. Mathematical-modeling of microbial-growth - a review. **Journal of Food Safety**, v. 14, n. 3, p. 175-217, 1994.

SLONGO, A. et al. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 303-306, 2009.

SMITH, F. E. Population dynamics in *Daphnia magma*. **Ecology**, n. 44, p. 651-663, 1963.

SOPER, H. E. et al. On the Distribution of the Correlation Coefficient in Small Samples. Appendix II to the Papers of "Student" and R. A. Fisher. **Biometrika**, v. 11, n. 4, p. 328-413, 1917.

SWINNEN, I. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137-159, 2004.

TANIWAKI, M. et al. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2-3, p. 100-108, 2009.

_____. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. **Advances in Food Mycology**, v. 571, p. 49-67, 2006.

TASSOU, C. et al. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2267-2276, 2007.

TSOULARIS, A.; WALLACE, J. Analysis of logistic growth models. **Mathematical Biosciences**, v. 179, n. 1, p. 21-55, 2002.

TURNER JR, M. E.; BRADLEY JR, E. L.; KIRK, K. A. A theory of growth. **Mathematical Biosciences**, n. 29, p. 367-373, 1976.

VADASZ, P.; VADASZ, A. Predictive modeling of microorganisms: LAG and LIP in monotonic growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 257-275, 2005.

VALIK, L.; BARANYI, J.; GORNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 141-146, 1999.

VALIK, L.; PIECKOVA, E. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 11-17, 2001.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 97-105, 2005.

_____. Dynamic Mathematical Model To Predict Microbial Growth and Inactivation during Food Processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2901-2909, 1992.

_____. Predictive microbiology in a dynamic environment - a system-theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 227-249, 1995.

VAN IMPE, J. F.; VERCAMMEN, D.; VAN DERLINDEN, E. Developing next generation predictive models: a systems biology approach. In: TAOUKIS, et al. **11th International Congress on Engineering and Food**, Atenas, Grécia. p. 465-466, 2011.

VELUGOTI, P. et al. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 796-803, 2011.

VERHULST, P. F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. **Corr. Math et Phys.**, v. Publ. par A., n. Quetelet T. X., p. 113-121, 1838.

VON BERTALANFFY, L. Quantitative laws in metabolism and growth. **Quarterly Review of Biology**, n. 32, p. 217, 1957.

WHITING, R.; BUCHANAN, R. A classification of models in predictive microbiology - reply. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.

WYATT, M. et al. Characterization of mold growth in orange juice. **Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 347-355, 1995.

XANTHIAKOS, K. et al. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1289-1298, 2006.

ZEIDE, B. Analysis of growth equations. **Forest Science**, v. 39, n. 3, p. 594-616, 1993.

ZWIETERING, M.; ROMBOUTS, F.; VANT RIET, K. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial-growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 2, p. 139-145, 1992.

ZWIETERING, M. H.; DEN BESTEN, H. M. W. Modelling: One word for many activities and uses. **Food Microbiology**, v. 28, p. 818-822, 2011.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of bacterial-growth with shifts in temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 204-213, 1994.

_____. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.