

Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos

W.S. ROBAZZA¹, J.T. TELEKEN, G.A. GOMES, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Educação Superior do Oeste, Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, SC, Brasil.

Resumo. Este trabalho teve por objetivo estimar o efeito que diferentes regimes de temperatura exercem sobre o crescimento de microrganismos em alimentos. Para tal fim, foi desenvolvido um modelo matemático que consiste de um sistema composto por duas equações diferenciais de primeira ordem, os quais descrevem diferentes aspectos do crescimento de populações. A temperatura foi incluída através do modelo da raiz-quadrada, o qual é utilizado com frequência na microbiologia e expressa a dependência da taxa de crescimento dos microrganismos com a temperatura. Foram avaliados regimes de temperatura isotérmicos e regimes dinâmicos, nos quais a temperatura variava com o tempo. Dados experimentais de crescimento de *Pseudomonas* em leite num regime isotérmico foram ajustados ao modelo e forneceram bom ajuste indicando que o modelo consegue reproduzir com boa precisão o crescimento deste microrganismo. Não foi possível avaliar o modelo para regimes dinâmicos da temperatura pela indisponibilidade de dados experimentais devido à dificuldade de realização de tais experimentos. Entretanto, foram feitas simulações com perfis teóricos de temperatura, os quais podem fornecer indícios importantes do crescimento de microrganismos em situações mais realísticas de coleta, transporte e armazenagem de alimentos nos quais há uma grande flutuação da temperatura.

1. Introdução

Muitos gêneros alimentícios são excelentes meios para o desenvolvimento de diferentes microrganismos e, se as condições forem favoráveis, o crescimento destes produzirá alterações no sabor, odor e aspecto dos alimentos. Do ponto de vista nutricional, o leite é considerado um dos alimentos mais completos, por apresentar em sua composição alto teor de proteínas, vitaminas e sais minerais tornando-se assim um excelente meio de cultura para os microrganismos devido a estas características, além da alta atividade de água e do pH próximo ao neutro [3].

A microbiologia preditiva está baseada na hipótese de que o efeito das propriedades dos alimentos como, por exemplo, o pH e a atividade de água, sobre o crescimento microbiano pode ser previsto através de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos [7]. A aplicação deste ramo da microbiologia foi estimulada pela necessidade de se garantir a qualidade dos alimentos

¹wrobazzi@yahoo.com.br

e a segurança do consumidor, pois tanto a espécie, quanto o comportamento dos microrganismos no alimento depende desses fatores e das condições ambientais às quais o alimento está sujeito (por exemplo, a temperatura) [7]. Um dos fatores apontados como responsáveis por esse crescente interesse na aplicação da microbiologia preditiva reside na conscientização por parte de muitos microbiologistas de alimentos de que os métodos de análise tradicionais, para determinação da qualidade e segurança dos alimentos eram limitados pelo tempo necessário para se obter um resultado e tinham, portanto, pouco valor preditivo, e que os métodos indiretos baseados em mudanças químicas, físicas ou físico-químicas exigiam um nível muito elevado de células para fornecer uma resposta. [6].

O emprego de modelos matemáticos para a previsão/explicação do crescimento biológico contribui de forma significativa para o estudo e desenvolvimento de novos testes e teorias a respeito do fenômeno envolvido. Ou seja, pode-se avaliar o efeito dos principais parâmetros envolvidos no fenômeno e assim buscar equacionar tais comportamentos, com o objetivo de estabelecer projeções futuras e seguras em relação ao fenômeno quanto à variação dos parâmetros envolvidos.

Os principais modelos de crescimento frequentemente estudados e utilizados são os modelos sigmóides de Gompertz e o modelo logístico. A equação logística, proposta originalmente por Verhulst no século XVIII, tem sido um modelo ilustrativo da dinâmica do crescimento em um habitat de recursos finitos. A equação logística baseia-se na noção de que a taxa de crescimento da população em um ambiente é proporcional à população e a quantidade de recursos disponíveis no habitat para a exploração [8]. Em 1825, Benjamin Gompertz propôs uma função que expressava a taxa de mortalidade de seres humanos. Após alguns anos o modelo de Gompertz, começou a ser utilizado por diversos autores como uma curva de crescimento, tanto para descrições econômicas quanto para fenômenos biológicos [12].

Os modelos preditivos podem ser usados como ferramenta de investigação e avaliação dos processos de conservação de alimentos, proporcionando uma resposta rápida e econômica para se obter informações confiáveis sobre o desenvolvimento microbiano no alimento, onde este pode estar sujeito a diferentes condições ambientais. A aquisição de tais informações poderia proporcionar a geração de uma base de dados, a qual poderia ser uma ferramenta útil para a elaboração de sistemas de informação para monitorar a qualidade do alimento em diversas situações.

O objetivo deste trabalho consiste em estudar e propor um modelo matemático, baseado em hipóteses físicas e biológicas de modelos de crescimento e o emprego do mesmo para descrever o crescimento de *Pseudomonas* em leite UHT. Outro objetivo consiste na verificação do efeito da temperatura sobre o crescimento teórico de microrganismos, propondo um modelo matemático para situações não isotérmicas.

2. Apresentação e Resolução do Modelo

A Figura 1 apresenta um gráfico típico do crescimento de microrganismos em alimentos. Em geral são observadas 4 fases: a fase “lag”, na qual o microrganismo está se adaptando ao meio, a fase exponencial, na qual o microrganismo já está adaptado ao ambiente em que está exposto e dirige todo o seu metabolismo para

a reprodução, a fase estacionária, na qual já começam a escassear os nutrientes e a taxa de reprodução é equivalente à taxa de mortes e a fase de declínio, na qual os microrganismos produzem toxinas e o número de mortes supera o número de novos microrganismos.

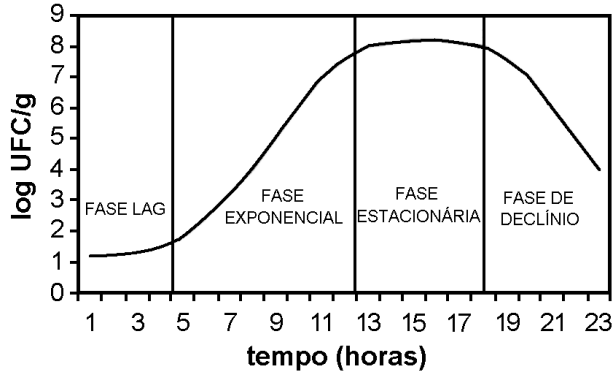


Figura 1: Curva de crescimento típica de microrganismos em alimentos expressa em logaritmo de unidades formadoras de colônia/gramas/hora.

O modelo proposto para descrição da curva de crescimento de microrganismos emprega um sistema de duas equações diferenciais ordinárias de primeira ordem. A primeira equação descreve o aumento do número de células em função do tempo e a segunda a taxa com que isso ocorre em função da população microbiana, sendo que nesta segunda equação estão incluídos termos relacionados com características fisiológicas e ambientais as quais os microrganismos estão sujeitos no leite.

A primeira equação que compõe o sistema é descrita pela equação diferencial ordinária básica, conhecida do estudo da dinâmica populacional [5]:

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

onde $N(t)$ é a população no instante t e $\mu(N)$ é a taxa de crescimento específico do microrganismo (variação da população por unidade de tempo por indivíduo). Essa equação propõe que a velocidade de crescimento da população é proporcional à taxa de crescimento específico do microrganismo.

Baseada na equação (2.1), a taxa de crescimento específico do microrganismo é descrita pela seguinte equação diferencial:

$$\frac{d\mu(N)}{dN(t)} = -\alpha \cdot N(t)^m, \tag{2.2}$$

onde m é, por hipótese, um parâmetro relacionado à espécie do microrganismo e α é um parâmetro positivo que engloba as condições ambientais sob as quais o microrganismo está sujeito. Na Equação 2.2 se propôs que a taxa de crescimento específico (velocidade de crescimento por indivíduo) decresce em função do aumento do número de microrganismos, isto porque conforme a população aumenta, há um

maior número de indivíduos disputando uma quantidade limitada de nutrientes, além da produção de toxinas por parte dos próprios microrganismos servir como fator de inibição do crescimento. Do ponto de vista matemático, foi introduzido o sinal negativo na Equação 2.2 para assegurar que a taxa de crescimento específico fosse uma função decrescente da população (pois a derivada é negativa). Por hipótese, a derivada de $\mu(N)$ com relação a N é proporcional a uma potência, m , da população.

Como condições iniciais das Equações 2.1 e 2.2, foi considerado que a população inicial, N_o , e a taxa de crescimento específico inicial, μ_o , eram conhecidas e dadas pelas expressões $N(0) = N_o$ e $\mu(N_o) = \mu_o$. Como a taxa de crescimento proposta decai com o aumento da população, isso indica que a taxa de crescimento inicial é equivalente à taxa de crescimento máxima do organismo, ou seja, o modelo está trabalhando apenas com a fase exponencial de crescimento. Algumas das equações tradicionais na descrição de crescimentos biológicos trabalham com este princípio, a equação logística e a equação de Gompertz modificada não consideram a fase de adaptação (fase lag), mas apenas o aumento do número de células, uma vez iniciado o crescimento exponencial [1], o que justifica a hipótese empregada, além de que no desenvolvimento microbiano a fase lag e exponencial são as de maior interesse para os microbiologistas de alimentos, pois para a maioria dos alimentos, a deterioração ocorre antes dos microrganismos chegarem à fase estacionária [7].

O modelo proposto pelo sistema de equações 2.1 e 2.2 foi resolvido analiticamente, iniciando a resolução pela Equação 2.2. Este procedimento resultou na expressão para a taxa de crescimento específico, $\mu(N)$, a qual após inserida na expressão 2.1 forneceu a seguinte função para a população:

$$N(t) = \begin{cases} N_o \left\{ \frac{\mu_o(m+1) + \alpha N_o^{m+1}}{\mu_o(m+1)e^{-t[\mu_o(m+1) + \alpha N_o^{m+1}]} + \alpha N_o^{m+1}} \right\}^{\frac{1}{m+1}}, & m \neq -1 \\ N_o e^{\left[\frac{\mu_o(e^{\alpha t} - 1)}{\alpha e^{\alpha t}} \right]} & , m = -1. \end{cases} \quad (2.3)$$

A Figura 2 apresenta uma curva teórica obtida com o emprego da Equação 2.3, sendo que foram empregados os seguintes valores para os parâmetros: $m = 1$, $N_o = 1000$, $\mu_o = 1$ e $\alpha = 0.001$. O gráfico expressa o aumento da população em função do tempo, onde a ordenada representa o aumento populacional (em centenas) e a abscissa representa o tempo (em horas). Conforme pode ser visualizado, o gráfico teórico apresentado na Figura 2 se comportou de forma similar ao gráfico apresentado na Figura 1, fato este que justifica as hipóteses empregadas na formulação do modelo.

Conforme previamente mencionado, o parâmetro α está relacionado com o meio no qual o microrganismo está inserido. Como o ambiente exerce grande influência sobre o crescimento do microrganismo, este parâmetro está explicitamente associado à população máxima a qual o organismo irá atingir, N_f . Usando como base esse princípio, é possível relacionar o parâmetro α à população máxima através do cálculo da assíntota horizontal da curva que descreve $N(t)$. Usando este procedimento, a

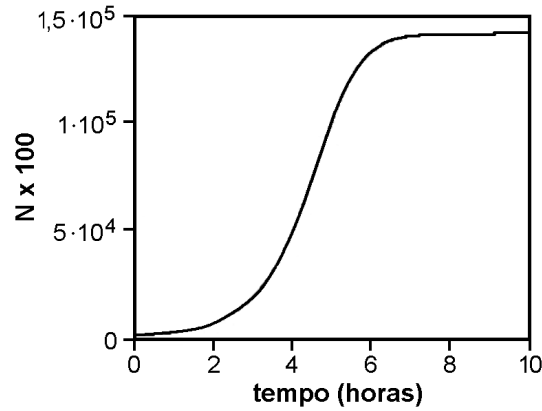


Figura 2: Curva teórica de crescimento dada pela expressão 2.3 para os seguintes valores dos parâmetros: $m = 1$, $N_o = 1000$, $\mu_o = 1$ e $\alpha = 0.001$.

Equação 2.3 pode ser re-escrita como:

$$N(t) = \begin{cases} N_f \left\{ \left(\frac{N_f^{m+1} - N_o^{m+1}}{N_o^{m+1}} \right) e^{-t \left[\frac{\mu_o(m+1)N_f^{m+1}}{N_f^{m+1} - N_o^{m+1}} \right]} + 1 \right\}^{-\frac{1}{m+1}}, & m \neq -1 \\ N_o e^{\ln(N_f/N_o) \left[1 - e^{-\frac{t\mu_o}{\ln(N_f/N_o)}} \right]}, & m = -1. \end{cases} \quad (2.4)$$

A Figura 3 apresenta um esboço do gráfico da Equação 2.4 para diferentes valores de m , sendo os demais parâmetros mantidos fixos. Observa-se que como a população final está fixada em $N_f = 100$, o valor de m afeta a velocidade com que a assíntota da curva é atingida, sendo que quanto maior for o valor deste parâmetro, mais rápido a população alcançará seu valor máximo.

3. Ajuste do Modelo a Dados Experimentais

O ajuste do modelo aos dados experimentais foi realizado através do emprego do *software* Origin 6.0. Os dados experimentais foram obtidos na base de dados COMBASE (www.combase.cc), a qual é a fonte de referências mais importante da área, contendo dados referentes ao crescimento de diferentes microrganismos em alimentos, sujeitos a diversas condições de temperatura, pH e atividade de água. Foram selecionados dados experimentais de crescimento microbiano de *Pseudomonas* em leite UHT, a uma temperatura constante de 25°C, com pH de 6,5 e atividade de água de 0,997, sendo que os dados selecionados foram medidos no Australian Food Safety Centre of Excellence da Universidade da Tasmânia, localizada em Hobart, Austrália.

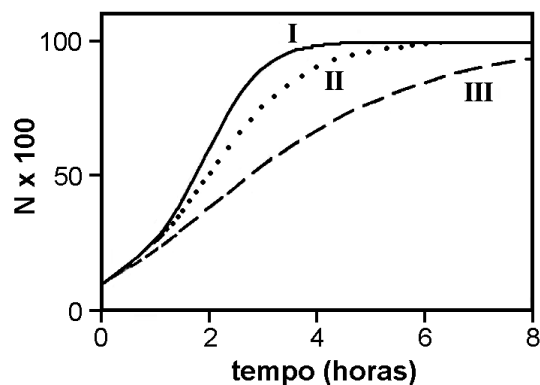


Figura 3: Curva teórica de crescimento microbiano para I) $m = 1$, II) $m = 0$ e III) $m = -1$, sendo $N_f = 100$ e $\mu_o = 1$ nas três situações.

A função obtida (com $m \neq -1$) foi empregada para descrever dados do crescimento de *Pseudomonas* em leite UHT. A Figura 4 mostra o ajuste do modelo proposto neste trabalho para os dados experimentais:

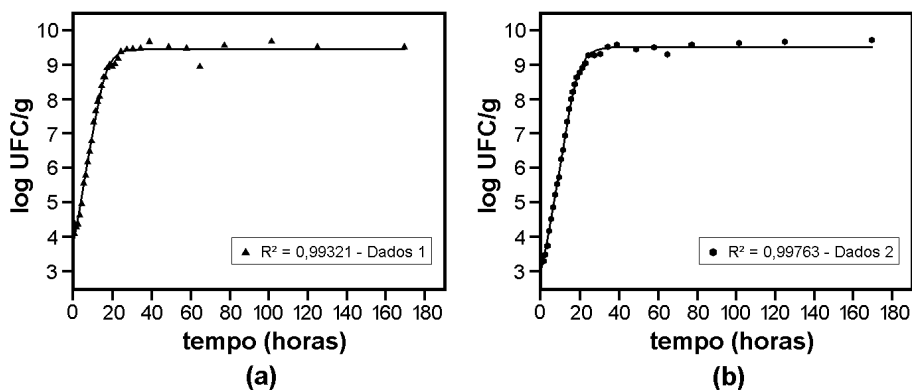


Figura 4: Curva de crescimento ajustada a dados experimentais de *Pseudomonas* em leite UHT, utilizando a expressão 2.4.

Na Figura 4 estão representados dois conjuntos de dados experimentais, os quais foram ajustados pelo modelo proposto. Em ambos os casos o coeficiente de determinação, R^2 , foi superior a 0,99, indicando um bom ajuste. Os parâmetros calculados através do ajuste foram: Dados 1- $N_o = 3,9934$, $N_f = 9,4587$, $\mu_o = 0,0665$ e $m = 2,9447$; Dados 2- $N_o = 3,1395$, $N_f = 9,5146$, $\mu_o = 0,0747$ e $m = 2,2884$. Apesar do bom ajuste dos dados, o modelo pode não apresentar o mesmo desempenho quando aplicado a dados de crescimento em que a fase lag se faz nitidamente presente, o que não foi observado nos dados da Figura 4. Isto se deve ao fato de que o modelo foi proposto levando apenas em consideração a fase de crescimento exponencial.

4. Modelagem para Regimes Dinâmicos da Temperatura

Em estudos envolvendo o crescimento de microrganismos, é bem reconhecido que a temperatura exerce uma influência muito grande na duração da fase lag, na velocidade de crescimento e na população final de células, sendo assim um fator que deve ser considerado para avaliação da taxa de crescimento específico das populações microbianas [10].

A maior parte dos modelos encontrados na literatura, geralmente assume que a temperatura se mantém constante durante todo o processo de crescimento [4, 2]. Entretanto, em situações reais de processamento, transporte e armazenamento, a temperatura do alimento não se mantém constante. Por essa razão, o modelo proposto foi incrementado a fim de se obter um novo modelo, o qual fosse capaz de prever a vida útil dos alimentos em condições dinâmicas de temperatura.

Como α é, por hipótese, o parâmetro relacionado às condições ambientais as quais o microrganismo está sujeito e a temperatura é um dos principais fatores que influenciam a taxa de crescimento do microrganismo, o seguinte fator que relaciona essas duas variáveis foi incluído na Equação 2.2 [9].

$$\sqrt{\alpha} = b[T(t) - T_{min}]\{1 - e^{c(T(t)-T_{max})}\}, \quad (4.1)$$

onde T_{min} e T_{max} são as temperaturas mínima e máxima, respectivamente, onde ocorre o crescimento, sendo uma característica intrínseca de cada espécie de microrganismo, b e c são parâmetros ajustáveis e $T(t)$ representa a temperatura a que o alimento está sujeito.

Com a inclusão da equação à equação 2.2, tem-se um modelo de crescimento, o qual possibilita que a temperatura não seja constante, conforme pode ser visualizado no sistema de equações 4.2:

$$\begin{cases} \frac{dN(t)}{dt} = \mu(N)N(t) \\ \frac{d\mu(N)}{dN(t)} = -\{b[T(t) - T_{min}][1 - e^{c(T(t)-T_{max})}]\}^{-2}N^m. \end{cases} \quad (4.2)$$

O modelo de crescimento proposto pelo sistema de equações 4.2 foi resolvido analiticamente, sendo empregado procedimento análogo ao utilizado para a situação isotérmica. Os resultados para a população no instante t , encontram-se expressos na Equação 4.3:

$$N(t) = \left[\frac{e^{\int_0^t [\mu_0(m+1) + \alpha(t)N_0^{m+1}] dt}}{\frac{1}{N_0^{m+1}} + \int_0^t \alpha(t).e^{\int_0^t [\mu_0(m+1) + \alpha(t)N_0^{m+1}] dt}} \right]^{\frac{1}{m+1}}, \quad (4.3)$$

onde $\alpha(t) = \{b[T(t) - T_{min}][1 - e^{c(T(t)-T_{max})}]\}^{-2}$.

Para simulação da curva teórica de crescimento dada pela Equação 4.3 sob um perfil dinâmico de temperatura foi empregado o *software* Machcad Professional. Neste estudo foram empregados dois perfis teóricos, os quais se encontram descritos na Figura 5, sendo a temperatura expressa em graus Celsius e o tempo em horas.

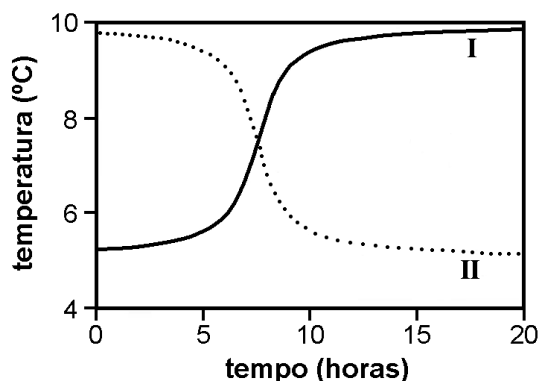


Figura 5: Dois perfis teóricos da temperatura para análise da Equação 4.3.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos com a curva teórica de crescimento dada pela Equação 4.3, sob regimes de temperatura constante e de temperatura variável, sendo estes dados pelos perfis de temperatura da Figura 5. Esta figura mostra gráficos obtidos para o crescimento de um microrganismo hipotético cujas temperaturas características, T_{min} e T_{max} , são respectivamente iguais a 4°C e 20°C . Os perfis apresentados referem-se às seguintes condições: I) temperatura constante igual a 5°C ; II) perfil de temperatura I da Figura 5; III) temperatura constante igual a 19°C ; IV) perfil de temperatura II da Figura 5; V) temperatura constante igual a 15°C . O eixo das ordenadas representa a quantidade de microrganismos em centenas e o eixo das abscissas o tempo, em horas.

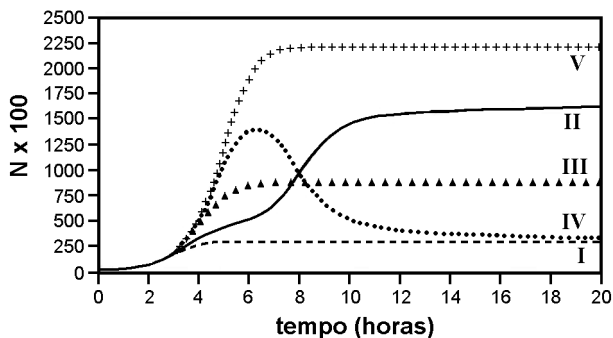


Figura 6: Gráficos da população de microrganismos em função do tempo para diferentes perfis da temperatura.

Pode-se observar na Figura 6 que quando foram empregadas condições de crescimento sob um regime isotérmico, as curvas de crescimento microbiano apresentaram-se na forma sigmoide, correspondendo ao comportamento padrão de curvas de crescimento. Para o perfil dinâmico de temperatura, nota-se que para o perfil de temperatura II ilustrado na Figura 5 (temperatura variando de 10°C até 5°C ao longo do tempo), a velocidade de crescimento imediatamente após a fase lag é alta

(curva número IV na Figura 6). Com o decorrer do tempo a temperatura decai de 10°C para 5°C, o que gera como resposta uma queda da taxa de crescimento em virtude da temperatura aproximar-se da temperatura mínima de crescimento. No perfil de temperatura I ilustrado na Figura 5 (curva número II na Figura 6), ocorre um comportamento diferente, sendo que a velocidade de crescimento da população após a fase lag é baixa, pois a temperatura é próxima a T_{min} , sendo observado um aumento dessa velocidade no momento em que a temperatura atinge 10°C. Tal comportamento está ilustrado na curva contínua em negrito na Figura 6, onde o comportamento da fase exponencial de crescimento é alterado. Observa-se que apesar do modelo não isotérmico responder de forma eficiente às situações propostas, são necessários mais estudos para confirmação da eficiência do mesmo. Dentre esses, incluem-se estudos envolvendo diferentes microrganismos e diferentes perfis de temperatura, que visem à descrição de situações realmente observadas na indústria.

5. Conclusões

Os resultados obtidos pelo ajuste dos dados de crescimento de *Pseudomonas* em leite UHT indicam que o modelo empregado consegue reproduzir com precisão as diferentes fases presentes no crescimento deste microrganismo. Estes resultados tendem a fortalecer a convicção que os padrões de crescimento observados nos regimes dinâmicos de temperatura correspondem a um comportamento próximo do que é observado em situações reais. Estudos adicionais e a inclusão de um termo explícito para a presença da fase lag são passos importantes para que o modelo proposto possa ser utilizado com confiança pela indústria de alimentos.

Abstract A mathematical model for evaluation of growth of microorganisms in food is presented. Growth is estimated under different temperature regimes. The new model is composed by two differential equations of first order which account for different features of population growth. Temperature was included by employing a square-root dependence with growth rate as is usually found in food microbiology field. There were evaluated isothermal and dynamic temperature regimes in order to fit model parameters. Experimental data from growth of *Pseudomonas* in milk with temperature kept constant were fitted and results showed good accuracy. Experimental data from growth in a dynamic temperature profile were not available due to the difficulty in obtaining such data. Simulations with theoretical profiles of variable temperature were conducted. Data obtained from such simulations can provide useful information about microorganism growth in situations where many temperature fluctuations occur.

Referências

- [1] J. Baranyi, A. Métrisa, Y. Le Marc, A. Elfwing, A. Ballagi, Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*, *International Journal of Food Microbiology*, **100** (2005), 13–19.
- [2] F. Devlieghere, J. Debevere, J. Van Impe, Concentration of predict carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified

- atmosphere on microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*, **43** (1998), 105–113.
- [3] B.D.G.M. Franco, M. Landgraf, “Microbiologia dos Alimentos”, São Paulo, Atheneu, 2007.
- [4] L. Gianuzzi, A. Pinotti, N. Zaritzky, Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature, *International Journal of Food Microbiology*, **39** (1998), 101–110.
- [5] R.C. McKellar, X. Lu, “Modeling Microbial Response in Food”, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2004, 344p.
- [6] T.A. McMeekin, M.B. Olley, T. Ross, D.A. Ratkowsky, “Predictive Microbiology: Theory and Application”, Researches Studies, p. 1-86, 1993.
- [7] S.M.K. Nakashima, D.S. André, B.D.G.M. Franco, Revisão: aspectos básicos da microbiologia preditiva, *Brazilian Journal of Food Technology*, **3** (2000), 41–51.
- [8] M. Peleg, M.G. Corradini, M.D. Normand, The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited, *Food Research International*, **40** (2007), 808–818.
- [9] D.A. Ratkowsky, R.K. Lowry, T.A. McMeekin, A.N. Stokes, R.E. Chandler, Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range, *Journal of Bacteriology*, **154**, No. 3 (1983), 1222–1226.
- [10] D.A. Ratkowsky, J. Olley, T.A. McMeekin, A. Ball, Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures, *Journal of Bacteriology*, **54**, No. 1 (1982), 1222–1226.
- [11] P. Walstra, J.T.M. Wouters, T.J. Geurts, “Dairy Science and Technology”, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2006, 690p.
- [12] C.P. Winsor, The Gompertz curve as a growth curve, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **18** No. 1 (1931), 01–08.