

MICROBIOLOGIA PREDITIVA: ASPECTOS GERAIS E TENDÊNCIAS

Predictive microbiology: general aspects and tendencies

Klaus Peter Schlei*, Mercedes Gabriela Ratto Reiter¹, Sávio Leandro Bertoli¹, Silvana Licodiedoff², Lisiane Fernandes de Carvalho¹; Carolina Krebs de Souza¹

*Universidade Regional de Blumenau (FURB) – Departamento de Engenharia Química
R. São Paulo, 3250. Itoupava Seca, Blumenau, SC. CEP: 89030-080
Telefone: 47 3221-6049. E-mail: klaus.schlei@gmail.com

¹ Universidade Regional de Blumenau (FURB), Centro de Ciências Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ) - Departamento de Engenharia Química, Blumenau/SC – Brasil

² Universidade Regional de Blumenau (FURB), Centro Ciências Tecnológicas - Departamento de Engenharia Química, Blumenau/SC – Brasil

Recebido em: 01/02/2018, Aceito em: 03/04/2018, Publicado em: 01/08/2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.22407/1984-5693.2018.v10.p.52-68>

RESUMO

Os primeiros trabalhos que procuraram prever o crescimento de microrganismos em função do tempo foram realizados por pesquisadores como Bigelow, Esty e Meyer na década de 1920. Nos últimos anos, órgãos de saúde pública de diversos países incentivaram estudos referentes à cinética de microrganismos em alimentos a fim de entender processos de crescimento de deteriorantes e patógenos. A partir destes trabalhos obtiveram-se modelos primários determinísticos e não determinísticos do crescimento de microrganismos. Novas abordagens permitem modelar o comportamento de microrganismos em função de variáveis do meio. Nas últimas décadas a criação de modelos estocásticos permitiu o desenvolvimento de novos modelos determinísticos, porém agora baseados em redes de fluxos metabólicos que permitiram o aumento da efetividade da predição do crescimento em função do tempo e de diversas variáveis e substratos. A modelagem em redes neurais artificiais pode ser aplicada em conjunto com outros modelos matemáticos e esta nova abordagem permite incluir qualquer variável na modelagem a partir de treinamento da rede neural. O desenvolvimento de softwares que utilizam modelos matemáticos de crescimento é de grande importância para a indústria de alimentos, pois permite maior compreensão dos processos microbiológicos, estimativa de vida de prateleira e as inovações na área permitem simulação da influência de diversos fatores.

Palavras-chave: modelagem microbiológica, predição de crescimento, redes neurais, microbiologia, preditiva, redes de fluxo metabólico.

ABSTRACT

The first researches attempting to predict the microorganisms growth depending on time were done by researchers like Bigelow, Esty and Meyer in the 1920s years. Over the last years public health authorities of different countries have encouraged studies over the microbiological kinetics in food, intended to understand the growing of pathogens. From these works it was possible to get deterministic and non-deterministic mathematical growth models. Newest approaches are able to model with effectiveness the microorganism's behavior in function of environmental variables. In recent decades the development of stochastic and deterministic models, moreover the application of these models in neural networks have increased the effectiveness of growing prediction in function of time and other variables of the environment and subtract. The development of new software which apply these concepts and models have improved the prediction of microbial growing and it's greatly important at the food industry and it allows the comprehension of the microbiological processes and shelf-life estimating and simulations over the influence of an amount of factors.

Keywords: microbial modeling, growth prediction, neural networks, predictive microbiology, metabolic flux networks.

INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são comuns em todas as populações, estas apresentam uma série de sintomas ao infectado (BRADEN & TAUXE, 2013) e são a causa de morbidade e mortalidade em todos os países do mundo (KIRK *et al.*, 2015). Segundo levantamento do Ministério da Saúde e da Secretaria de Vigilância em Saúde, no Brasil durante o ano de 2014, 15.700 pessoas foram diagnosticadas com casos de DTA (BRASIL, 2014) e representam problemas de saúde alimentar em diversos países. No ano de 2012, somente nos Estados Unidos, ocorreram 19.531 infecções confirmadas por análises laboratoriais, 4.563 hospitalizações e 68 mortes decorrentes de doenças de origem alimentar (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). A microbiologia preditiva, na área de alimentos, é aplicada para manutenção da segurança do alimento na cadeia de produção e distribuição de alimentos. Na indústria de alimentos esse conhecimento é interessante para assegurar a segurança alimentar, tanto para estimativa da vida de prateleira de alimentos (BRUCKNER *et al.*, 2013), como para avaliação da alteração de fatores de formulação e armazenamento (PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013). A microbiologia preditiva baseia-se no uso de modelos matemáticos para estimativa do crescimento microbiológico (PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013; MØLLER *et al.*, 2013; HUANG, 2014). Acredita-se que a origem da microbiologia preditiva como ciência ocorreu através de Bigelow e Esty em 1920, os quais propuseram modelos de cinética de inativação bacteriana em função de tratamento térmico (FAKRUDDIN *et al.*, 2011; PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013). Esta revisão referente aos aspectos básicos e avanços dos últimos anos na área de microbiologia preditiva tem o intuito de expor o contexto atual da ciência. Também são expostas as contribuições alcançadas e tendências da microbiologia preditiva aplicada para a segurança alimentar.

ASPECTOS BÁSICOS DA MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Uma típica curva de crescimento microbiano é composta pela fase *lag*, fase exponencial, e fase estacionária. Alguns autores consideram dividir a curva de crescimento não somente nas três fases citadas anteriormente, mas também incluem nesta curva a fase de desaceleração (DELHALLE *et al.*, 2012; HALL *et al.*, 2014), conforme apresentado na Figura 1. Delhalle *et al.* (2012) propõem estudar curvas de crescimento microbiano em 5 distintas fases de crescimento:

- Fase de latência: fase após a inoculação de microrganismos, onde se multiplicam lentamente;
- Fase de aceleração: fase que marca a saída da fase de latência. Neste momento a velocidade de crescimento exponencial não foi alcançada, mas os microrganismos já entraram em fase de multiplicação;
- Fase exponencial: nesta fase a velocidade máxima de crescimento é alcançada;
- Fase de desaceleração: nesta fase ocorre a redução da velocidade de multiplicação, antecedendo a entrada na fase estacionária;
- Fase estacionária: a velocidade de multiplicação de microrganismos é nula nesta fase.

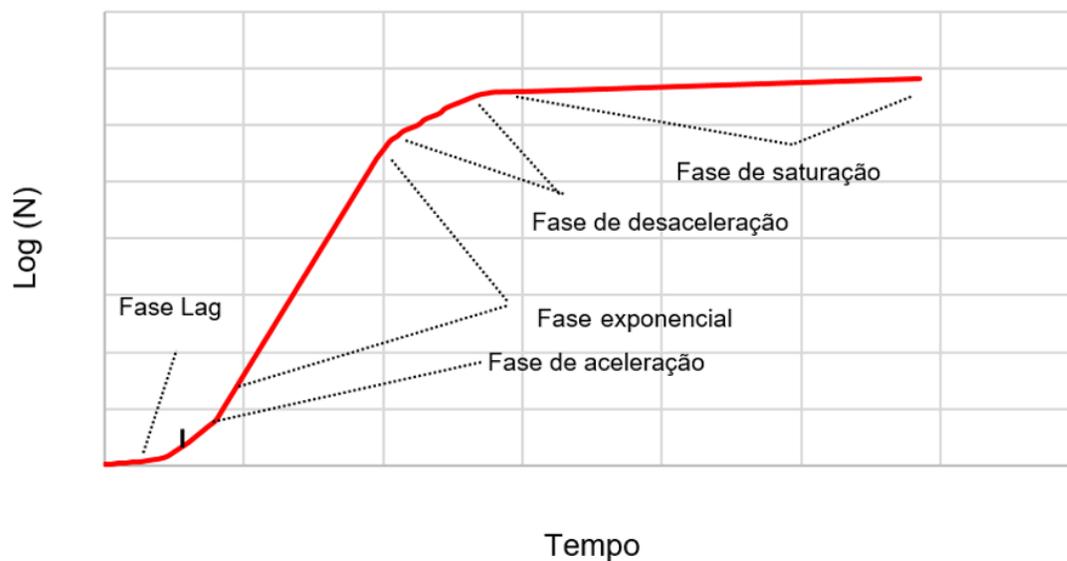


Figura 1. Curva de crescimento microbiano. Fonte: Adaptado de Delhalle *et al.* (2012).

No estudo da cinética microbiana costuma-se definir a duração da fase de latência como λ , e a velocidade de crescimento microbiano como u_{\max} alcançada na fase exponencial, chegando-se a fase estacionária (DELHALLE *et al.*, 2012).

Além das curvas de crescimento as curvas de inativação são uma importante ferramenta para a segurança alimentar e incremento da qualidade em tratamentos térmicos. Pode-se obter aumento de qualidade pela possibilidade de redução de tempo e temperatura no tratamento térmico, obtendo-se o mesmo efeito de inativação de microrganismos (GARRE *et al.*, 2017). Entre os distintos trabalhos analisados, muitos destes fizeram o uso de modificações dos modelos de Gompertz para predição da inativação (DUAN *et al.*, 2016; SCHELEGUEDA *et al.*, 2017). Outros modelos também são utilizados para inativação como os de Richard, Stannard e Whiting, Buchanan, Reine (TORNUK *et al.*, 2014), log-linear, shoulder-tail, Weibull, Weibull-tail, Weibull modificado (BELACQUA *et al.*, 2015), e Bigelow (PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013).

A primeira proposição de classificação de modelos em primários, secundários e terciários, foi feita por Whiting e Buchanan (1993). No estudo de modelos de microbiologia preditiva, estes são classificados em três grupos: primários (sem variação de fatores ambientais), secundários (com variações de fatores ambientais) e terciários (integrando modelos em softwares).

1. MODELOS DE CRESCIMENTO PRIMÁRIOS

Modelos primários tomam apenas a variação de concentração celular com o tempo em consideração. A concentração geralmente será o número de células. Uma curva de mortandade, ou crescimento de microrganismos pode ser considerada um modelo primário. Estes modelos não levam variáveis do meio, como temperatura ou pH, em consideração (PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013).

O primeiro modelo de predição do crescimento de microrganismos foi o modelo exponencial de Buchanan (1918). O modelo de Buchanan previa apenas o crescimento microbiano na fase exponencial, não levando em conta a fase de latência (fase *lag*), ou nem mesmo a fase estacionária. Da forma como o modelo foi concebido por Buchanan, considerava-se matematicamente que todas as células iniciam seu crescimento em um mesmo momento, não havendo a fase de aceleração do crescimento. Porém, a partir do simples modelo de Buchanan, pode-se com facilidade definir o importante parâmetro de u_{max} (DELHALLE *et al.*, 2012).

Na literatura há discordância quanto à existência de um modelo com melhores ajustes de curva. Porém, baseando-se na literatura, Pla *et al.* (2015), concluem que os modelos mais utilizados são o Logístico, Gompertz, Roberts e Baranyi, Richards e Linear de três fases.

1.1. O MODELO PRIMÁRIO LOGÍSTICO

Na década de 1920, Pearl (1927) dedicou um capítulo de sua obra à curva logística, onde afirmou que a equação da curva foi encontrada por experimentação e observação, e esta foi inicialmente descoberta por Verhulst em 1838 (CHATTERJEE *et al.*, 2015).

Segundo Chatterjee *et al.* (2015), o modelo Logístico, pode ser definido pela equação 1, onde N é o número de unidades formadoras de colônias (UFC), N_x a quantidade máxima de UFCs, t o tempo e r a taxa de crescimento efetivo:

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{N_x} \right) \quad (1)$$

Subramaniam e Wareing (2016) descrevem a solução para o modelo logístico como apresentada na equação 1:

$$\log N(t) = \log N_{\text{máx}} + \log \left(\frac{(-1 + e^{\mu \times \lambda}) + e^{\mu \times t}}{e^{\mu \times t} - e^{\mu \times \lambda} \times 10^{\log(N_{\text{máx}}) - \log(N_0)}} \right) \quad (1)$$

Onde N é o número de células em função do tempo t, N₀ a quantidade inicial de células, μ a velocidade específica de crescimento, N_{máx} a concentração máxima de células, e λ a duração da fase lag.

1.2. MODELO PRIMÁRIO DE GOMPERTZ

O modelo de Gompertz é um dos mais utilizados na atualidade devido a sua simplicidade (BELDA-GALBIS *et al.*, 2013; BRUCKNER *et al.*, 2013; CHATTERJEE *et al.*, 2015), pode ser modelado como na equação 2 (GIBSON *et al.*, 1988; ZWITERING *et al.*, 1990):

$$\log_{10}(N_t) = A + C * e^{-e^{-B(t-M)}} \quad (2)$$

Na equação 2 pode-se verificar o modelo de Gompertz na sua forma algébrica. Neste modelo, N_t é a quantidade de microrganismos no tempo t, A é a concentração inicial de microrganismos, C é a diferença entre as assíntotas (entre o valor mais baixo e mais alto), e B é a velocidade de crescimento quando (t - M), sendo que M representa o ponto assintótico (ponto onde a velocidade de crescimento que aumentava passa a cair).

1.3. O MODELO DE BARANYI E ROBERTS

O modelo de Baranyi e Roberts é utilizado na microbiologia preditiva, como observado nas obras de Hunang (2013) e Longhi *et al.* (2014). Muitos modelos propostos anteriormente a este modelo descreveram o crescimento de microrganismos, estes não foram deduzidos a partir de considerações mecanísticas, isto é, os seus termos não foram escritos a partir de mecanismos biológicos. Por isso, há uma lacuna de bases biológicas. Muitas vezes, isso dificulta a interpretação mecanística de seus parâmetros. Partindo deste problema, o modelo de Baranyi e Roberts foi desenvolvido a fim de levar em conta o mecanismo biológico de crescimento dos microrganismos (SUBRAMANIAM & WAREING, 2016). O modelo aproxima-se de uma curva sigmoide, apesar de que a sua fase intermediária aproxima-se de uma reta, ao contrário de clássicas curvas sigmoides (GINSON *et al.*, 2015).

Medina *et al.* (2012) e Tremarin *et al.* (2015), verificaram que o modelo de Roberts e Baranyi apresentou também boa correlação quando aplicado a microrganismos filamentosos, podendo-se concluir que o modelo é eficiente também para modelar o crescimento de filamentosos.

O modelo de Roberts e Baranyi (1994), é descrito por Tsironi *et al.* (2017) conforme apresentado nas equações 1,2 e 3:

$$y(t) = y_0 + kA(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{kA(t)} - 1}{e^{y_{\max}} - y_0} \right) \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{k} \ln \left(\frac{e^{kt} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (2)$$

$$\lambda = \frac{\ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right)}{k} \quad (3)$$

No modelo de Roberts e Baranyi, $y(t)$ é a quantidade de microrganismos no tempo t , y_0 é a concentração inicial de microrganismos, k é a velocidade de crescimento, y_{\max} é a concentração máxima de microrganismos, q_0 representa um parâmetro teórico que expressa o estado fisiológico inicial das células, e λ é a fase *lag*.

2. MODELOS SECUNDÁRIOS

Muitos métodos tradicionais de determinação da vida de prateleira de alimentos consideram temperatura constante (SILVA, 2013). Sabe-se que temperaturas menores tendem a reduzir a velocidade de crescimento de microrganismos por redução de atividades enzimáticas e síntese proteica (EDELSTEIN, 2013). Esta situação não é verificada nos processos de armazenamento, transporte e aquisição dos alimentos, pois curtos picos de temperatura podem causar deterioração (SILVA, 2013). Diferente dos modelos primários, previamente discutidos, que não levam em conta em seus termos matemáticos variáveis dos meios, como pH e temperatura, os modelos secundários levam em conta variáveis e suas alterações ao longo do tempo (WHITING & BUCHANAN, 1993; PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013).

A partir de velocidades de crescimento para determinadas temperaturas e condições obtidos, e utilizando-se de modelos primários, pode-se obter parâmetros que satisfaçam modelos secundários. Para isto, a partir de velocidades de crescimento de modelos primários, pode-se determinar por regressão, coeficientes do modelo secundário escolhidos, que predizem a velocidade de crescimento de microrganismos. O modelo escolhido em conjunto dos coeficientes regredidos permite prever o crescimento de microrganismos em condições variáveis, diferentemente dos modelos até então apresentados, aplicáveis a condições como pH e temperaturas constantes (BAERT *et al.*, 2007; STAMATI *et al.*, 2016).

Normalmente modelos secundários podem ser divididos em duas classes (PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013):

- Modelos Polinomiais: o efeito causado por parâmetros ambientais é descrito por uma função polinomial;
- Modelos do tipo raiz e cardinal: o efeito, u_{\max} , por exemplo, é modelado por equações a parte. Sendo os mais populares o modelo da raiz quadrada e os modelos do tipo cardinal.

2.1 MODELO DA RAIZ QUADRADA

O modelo de Ratkowsky *et al.* (1983), mais conhecido como modelo da Raiz Quadrada, permitia modelar a velocidade de crescimento de microrganismos em função da temperatura. Situação contrária às tentativas realizadas por outros pesquisadores, o modelo da raiz quadrada de Ratkowsky, utilizava “parâmetros cardinais”, como a temperatura máxima e a temperatura mínima de ocorrência de crescimento do organismo para predição da velocidade de crescimento de microrganismos (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013). O modelo da raiz quadrada de Ratkowsky é frequentemente utilizado por microbiologistas para prever a velocidade de crescimento de microrganismos em função da temperatura e outras variáveis (RATKOWSKY; REDDY, 2017). Em seu trabalho, Ratkowsky *et al.* (1983) verificaram que era possível realizar predição da velocidade de crescimento dos microrganismos por meio de seu modelo para trinta cepas de diferentes bactérias, podendo a velocidade de crescimento obtida ser aplicada em modelos de crescimento. No modelo (Equação 1) O parâmetro b é uma constante que pode ser obtida por meio de regressão (DELHALLE *et al.*, 2012; KOWALIK & LOBACZ, 2015).

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{min}) \quad (1)$$

2.2 MODELO CARDINAL

Rosso *et al.* (1993) propuseram um novo modelo construído com considerações empíricas como nova ferramenta para descrever o crescimento microbiano. Nos argumentos dos autores, a criação do modelo é justificada, pois o modelo proposto por Ratkowsky *et al.* (1983) é restrito a um único parâmetro, sendo incompleto ante as diversas situações reais, onde ocorrem a variação de mais parâmetros. Desta forma foi proposto o modelo matemático da equação, conhecido como modelo cardinal.

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0, & \\ 0, \frac{(X - X_{m\acute{a}x})(X - X_{min})}{(X_{opt} - X_{min})(X_{opt} - X_{min})(X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max})((n - 1)X_{opt} + X_{min} - nX)} & \end{cases} \quad (2)$$

Neste modelo X pode ser a temperatura, pH ou atividade de água. E X_{min} , o valor mínimo onde não é mais observado crescimento microbiano, X_{opt} o valor no qual tem-se o maior crescimento microbiano possível, e $X_{m\acute{a}x}$ é valor cujo ultrapassado impede o crescimento de um determinado microrganismo (ROSSO *et al.* 1993). Delhalle *et al.* (2012) descrevem este modelo de uma forma genérica, aplicável então a temperatura, pH e atividade de água. Mesmo com curvas não simétricas, a estimação da velocidade de crescimento apresenta resultado relevante.

3. MODELOS ESTOCÁSTICOS

Para o modelo citado, Baranyi e Roberts (1995) evidenciaram em seus trabalhos que predições de crescimento microbiano da fase *lag* não são muitas vezes bem-sucedidas. Sendo necessário trabalhar com modelos estocásticos, através de estudos relatados por Baranyi (1998), e Baranyi e Pin (1999) e ainda outros autores (BARANYI, 2002).

A vantagem em utilizar modelos estocásticos dá-se pelo fato destes permitirem descrever variabilidade e incerteza, aumentando a qualidade da predição (ALONSO *et al.*, 2014; MEJLHOLM *et al.*, 2015). Modelos estocásticos são compostos por equações probabilísticas que trabalham com a variabilidade dos indivíduos (ANDREONI *et al.*, 2014; GOEL & RICHTER-DYN, 2016).

Sobretudo na fase *lag*, é possível observar o efeito da não utilização de modelos estocásticos em estimativas. Algumas células de uma hipotética população podem apresentar efeitos adversos na fase *lag*, como a saída antecipada da fase *lag* por parte de algumas destas. Esta pequena parcela da população, ou grupo de unidades celulares, pode multiplicar-se em maior velocidade que os demais indivíduos. Sabe-se que quando utilizados modelos determinísticos, são obtidos diferentes resultados em comparação com modelos estocásticos (BARANYI, 2002; GOEL & RICHTER-DYN, 2016).

Baranyi (2002) explicou em seu trabalho a modelagem de um simples sistema estocástico para modelagem das fases *lag* e fase exponencial, no qual utiliza-se uma distribuição probabilística da população de células presentes em determinado tempo t . Se em uma curva de crescimento tem-se N , o número de microrganismos presentes em função do tempo t , cada indivíduo pode ser modelado matematicamente. Esta abordagem foi concebida pelo conceito de “célula individual”. A grandeza τ_i , diferente de λ , a fase *lag* nas abordagens descritas até então, é o tempo da fase *lag* para uma única célula em um sistema. O modelo assume que cada célula que se multiplica uma vez, sai individualmente da fase *lag*, e sua velocidade de multiplicação, a partir deste momento, é a velocidade exponencial μ_{\max} . A equação 1 descreve o número de unidades formadoras de colônias descendentes em função do tempo para um único indivíduo da população. Mas como já foi dito, nem todos os microrganismos saem da fase *lag* em um mesmo período de tempo (BARANYI, 2002).

$$x_i = e^{\mu \max(0, t - \tau_i)} \quad (1)$$

Em virtude das diferenças entre os indivíduos faz-se necessário distribuir este crescimento calculado pela equação 1 em uma distribuição probabilística, ou em uma distribuição de densidade probabilística. Estas duas distribuições são representadas na figura 2 pela função de densidade de probabilidade na curva plotada em (a) e por meio do histograma de distribuição de probabilidade em (b). Ambas as representações são distribuições nas quais os respectivos autores trabalharam com tempo de fase *lag* e tempo de divisão celular.

Baranyi (2002) conseguiu provar que seu novo modelo é eficiente, avaliando-o em relação a cepas e experimentos da literatura. O referido autor enfatiza a importância do uso de modelos determinísticos obtidos a partir de modelos estocásticos, pois estes podem ser regredidos, obtendo-se então um modelo eficiente e de fácil utilização.

A partir destas informações, acredita-se que o incremento na qualidade dos resultados está ligado a correta predição da saída do microrganismo da fase *lag* (MEJLHOLM *et al.*, 2015). Situação singular pode ser observada no trabalho de Mejlholm *et al.* (2015) ao aplicar o modelo estocástico de Lm-LAB. Para realização deste experimento utilizou-se peixe defumado como substrato de crescimento e foi construído um modelo de crescimento para *Listeria monocytogenes* que inclui 12 fatores ambientais. Os autores utilizaram um modelo determinístico previamente publicado. O modelo determinístico foi expandido em um modelo estocástico utilizando o software Analytica e obteve-se boa acuracidade.

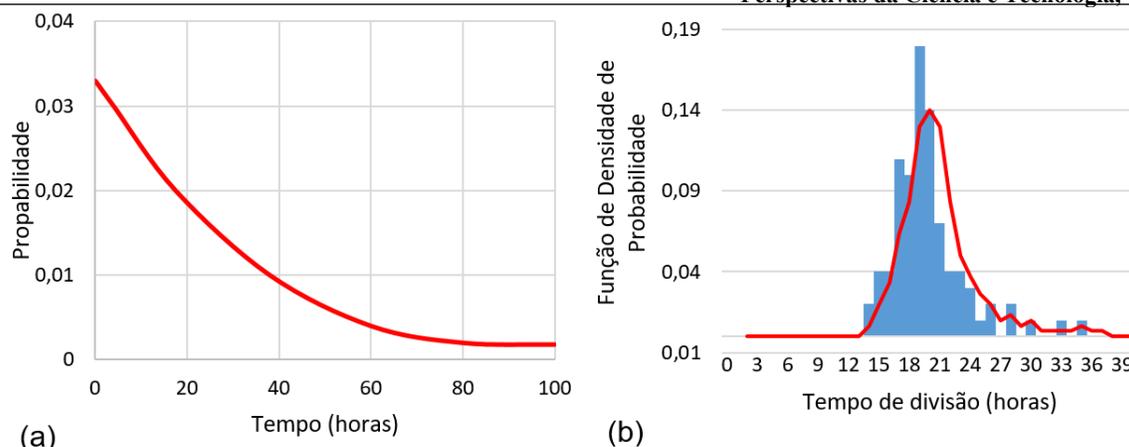


Figura 2. Função de densidade de probabilidade do tempo para saída da fase lag para uma população de microrganismos. Fonte: Imagens adaptadas de (a) Baranyi (2002) e (b) Stukalin *et al.* (2013).

4. MODELOS BASEADOS NO CONCEITO DE REDES DE FLUXO METABÓLICO

A aplicação de modelos baseados na abordagem de redes de fluxo metabólico para a área da microbiologia preditiva está em ascensão, pois esta classe de modelos também tem aplicação dentro da área de biotecnologia para a otimização e controle de bioprocessos (NIMMEGEERS *et al.*, 2015).

Modelos primários e secundários tradicionais sem abordagens mais complexas, como o tradicional modelo de Roberts e Baranyi (1994), são caixas-pretas, pois não consideram todos os fatores do ambiente como, por exemplo, a existência de uma cultura concorrente ou o estresse sofrido pela população em questão. Estes modelos tradicionais não consideram a estrutura do meio de crescimento quando se trata de um meio complexo (VAN IMPE *et al.*, 2013). A modelagem a partir do fluxo metabólico permite a criação de modelos determinísticos (KOUTSOUMANIS & ASPRIDOU, 2017).

Técnicas como a análise do fluxo metabólico e análise do balanço do fluxo metabólico dinâmico são bem conhecidas e aplicadas para predição de fluxos intracelulares, sendo na maioria das vezes aplicadas para situações no estado estacionário (NIMMEGEERS *et al.*, 2015). A principal diferença entre a análise de fluxo metabólico e a análise do fluxo metabólico dinâmico, reside na aplicação a processos estacionários da primeira e não-estacionários da segunda (MAHADEVAN *et al.*, 2002; LEIGHTY & ANTONIEWICZ, 2011).

Para estudos na área da microbiologia aplicando-se o conceito de redes metabólicas, é necessário ter conhecimento sobre os três níveis nos quais os eventos ocorridos são normalmente descritos: macroscópico, mesoscópico e microscópico. Van Impe *et al.* (2013) descrevem a “rede metabólica” com sua abordagem matemática fazendo uso da segmentação em níveis. O nível macroscópico é o nível onde é modelada a população total de microrganismos presentes. O nível mesoscópico inclui pequenas populações e subpopulações, e influências do meio. No nível microscópico são computados os eventos ocorridos a nível celular e extracelular.

As reações bioquímicas ocorrem dentro deste sistema, cujas, concentrações das redes de fluxo metabólico são calculadas por meio de relações estequiométricas das reações bioquímicas que ocorrem em um sistema composto por substrato e microrganismos. Estas reações estequiométricas e o crescimento microbiológico são representados na figura 3, onde o diagrama (a) representa o consumo de nutrientes A_{ext} , o produto celular B_{ext} , a biomassa produzida BIO e os metabolitos internos A e B . O quadro (b) é a tabela estequiométrica das reações ocorridas. A partir de representações como esta podem ser elencadas equações que regem metabolitos, substratos e excretados (VAN IMPE *et al.*, 2013).

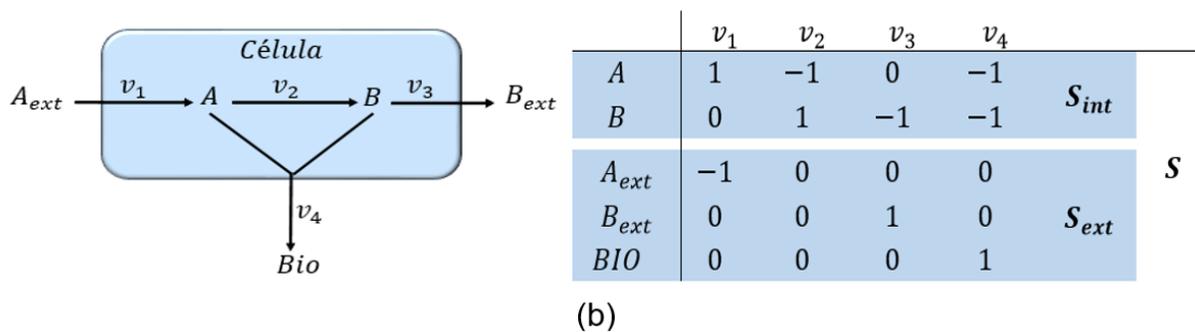


Figura 3. Esquema de substrato, metabolito e excretado em um modelo de fluxo metabólico. Fonte: Adaptado de Van Impe *et al.* (2013).

As equações que regem estes sistemas são dependentes da quantidade de substâncias excretadas ou consumidas pelos microrganismos, nutrientes, substrato e outros fatores. Estas equações geralmente constituem um sistema de equações diferenciais não-ordinárias. Para relacionar pH ou outros parâmetros ambientais com crescimento podem ser utilizadas equações do tipo cardinal, que foram anteriormente discutidas neste trabalho (VAN IMPE *et al.*, 2013).

O conceito de redes neurais foi estudado conjuntamente com modelos de fluxo metabólico por Geeraerd *et al.* em 1998 e Panagou *et al.* em 2007, com o propósito de viabilizar a aplicação da ferramenta de redes neurais artificiais utilizando-se da nova classe de modelos aplicados a microbiologia (VAN IMPE *et al.*, 2013).

5. REDES NEURAIS APLICADAS A MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Segundo Esser *et al.* (2015), apenas recentemente as redes neurais vieram a ter sua importância revelada na área de microbiologia preditiva voltada a alimentos. Um grande número de pesquisas voltadas para a área pode ser evidenciado na última década (FUNES *et al.*, 2015). Modelos de redes neurais artificiais são conhecidos por serem similares a técnicas estatísticas comumente difundidas, como regressão polinomial, especialmente quando a finalidade é a predição. Por meio de aprendizado sistemas de redes neurais artificiais podem ser aplicados a sistemas biológicos com alta variabilidade, diversos padrões, e diversas situações que envolvem biologia (GOSUKONDA *et al.*, 2015).

Em redes neurais artificiais as informações de entrada são os nós, ou ainda conhecidos como neurônios, que trocam informações com demais nós, de forma análoga ao que ocorre no cérebro humano (BASHEER & HAJMEER, 2000; FUNES *et al.*, 2015; ESSER *et al.*, 2015). A importante capacidade de aquisição de padrões de respostas, análogo a capacidade de aprendizado e adaptação do cérebro humano, é comumente denominada na área de redes neurais de “capacidade de aprendizado”. Esta capacidade torna a capacidade de resolução de problemas das redes neurais artificiais grande e variada (BASHEER & HAJMEER, 2000), permitindo então sua aplicação em sistemas biológicos (GOSUKONDA *et al.*, 2015).

Além de predição do crescimento microbiano, os algoritmos artificiais de redes neurais são também utilizados para obtenção de soluções para problemas de padrões de reconhecimento de estruturas proteicas, DNA, RNA e microrganismos (BASHEER & HAJMEER, 2000).

Apesar da implícita possibilidade de resolução de problemas, um algoritmo genético pode ser utilizado minimizando os erros que podem causar ruído nos resultados (ESSER *et al.*, 2015). Os algoritmos genéticos ajudam a explorar grupos de dados otimizando a obtenção da solução por meio de métodos iterativos, poupando recursos computacionais (JOSHI, 2014).

Gosukonda *et al.* (2015) testaram redes neurais para modelar a inativação de *Escherichia coli* por meio da passagem de corrente elétrica em carne bovina. A rede neural artificial foi modelada utilizando-se os algoritmos de aprendizado de “Filtro de Kalman” e “Propagação reversa”, obtendo-se excelentes resultados, como R^2 de até 0,96.

Oladunjoye *et al.* (2017) também testaram redes neurais, porém o seu trabalho tratava da modelagem do crescimento de *Listeria monocytogenes* em cenoura e tomate combinado com monolaurato de sucrose e bacteriófagos. As redes neurais permitem a interação de diversas variáveis e fatores, e respostas não lineares. As variáveis de entrada utilizadas foram temperatura, pH, número de células iniciais do patógeno, concentração de monolaurato de sucrose, tempo, tipo de substrato (tomate ou cenoura) e concentração de bacteriófagos, obtendo-se como saída o número de unidades formadoras de colônias do patógeno. A rede neural artificial foi modelada utilizando-se os algoritmos de aprendizado de “Propagação reversa” baseado no modelo logístico, obtendo-se R^2 de até 0,99. Na análise estatística alcançou-se ótimos resultados também para o índice MSE, onde obteve-se 0,1073 para a configuração com os melhores parâmetros.

Também aplicando diversos fatores, como pH, temperatura, nitrato de sódio e salinidade, os autores Chang *et al.* (2013), realizaram um estudo no qual compararam duas redes neurais artificiais, sendo uma implementada e outra não implementada com lógica Fuzzy para a predição de crescimento do *Leuconostoc mesenteroides*. Os autores avaliaram a predição utilizando as duas modelagens, obtendo bons resultados para acuracidade para as duas situações, com coeficientes de correlação linear (R^2) respectivamente 0,9937 para o modelo de rede neural artificial e 1,0000 para o caso implementado com lógica Fuzzy.

6. MODELOS TERCIÁRIOS (USO DE SOFTWARES)

Os softwares citados permitem uma análise das respostas de diversos microrganismos em diversos alimentos, utilizados por profissionais da área de segurança alimentar, indústrias de alimentos e acadêmicos. A tendência dos últimos anos tem sido o uso de softwares em ambiente on-line operados a partir de um navegador de internet, flexibilizando o seu uso (PEREZ-RODRIGUEZ & VALERO, 2013).

O software MicroFit permite ajuste de dados a diversos modelos preditivos não lineares. Esta ferramenta é gratuita e é conhecida pela sua facilidade de uso e interface simples (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

Os softwares para predição do crescimento de microrganismos tornaram-se populares nos últimos anos fazendo uso de lógicas mais elaboradas. O NeuralWorks (Carnegie, PA, USA) é uma poderosa ferramenta que permite trabalhar com algoritmos genéticos, estatística e lógica Fuzzy. Além deste pode-se citar também o software comercial Predict® pelos seus excelentes resultados (GOSUKONDA *et al.*, 2015). Em contrapartida autores como Daynac *et al.* (2015) utilizaram o software FANN (Fast Neural Networks) que é gratuito para obtenção de bons resultados de predição da atividade antimicrobiana de óleos essenciais para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, e *Clostridium perfringens*.

As funcionalidades de predição e regressão de dados, apontam que o *ComBase* é uma ferramenta que atua como banco de dados de cinéticas de crescimento e inativação de microrganismos em meios de cultura ou mesmo nos próprios alimentos (TENENHAUS-AZIZA & ELLOUZE, 2015).

O COMMGEN é uma ferramenta que aplica modelos metabólicos baseado em programação em Matlab. A ferramenta foi avaliada com 4 diferentes microrganismos alcançando bons resultados. Este código está disponível para download no site do autor principal do programa, Van Heck (VAN HECK, 2016).

Tenenhaus-Aziza e Ellouze (2015) apresentam uma excelente fonte de dados sobre 16 importantes softwares da área de microbiologia preditiva com recomendações aos interessados no uso das ferramentas. Recomenda-se a consulta à obra.

CONCLUSÕES

Os fenômenos de inativação ou crescimento de patógenos são complexos, e se comparados a fenômenos de outras áreas, poucos modelos os descrevem e poucos estudos foram desenvolvidos. Isso deve-se ao surgimento da microbiologia preditiva como ciência apenas na década de 80, e ainda à grande variabilidade das respostas que um microrganismo pode apresentar às inúmeras variáveis que influenciam a um determinado processo de crescimento ou inativação.

Grande parte dos trabalhos na área de microbiologia preditiva abordam modelos tracionais como o de Roberts e Baranyi, sendo que estes não abordam situações mais sofisticadas, adaptação ao meio, culturas concorrentes e a presença de inúmeras substâncias químicas.

Há uma tendência para modelos mecanísticos, nos quais pode-se compreender o significado dos termos envolvidos. Estes modelos podem envolver distribuições probabilísticas, tornando-os estocásticos com respostas mais precisas. Porém com o advento do uso de redes neurais artificiais, quando a tendência não é seguida para modelos mecanísticos, observa-se uma enorme quantidade de trabalhos fazendo uso desta classe de modelos, sendo estes motivados pela grande diversidade de situações que podem ser analisadas e modeladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A.A.; MOLINA, I.; THEODOROPOULOS, C. Modeling bacterial population growth from stochastic single-cell dynamics. **Applied and environmental microbiology**, 80(17), 5241-5243, 2014.

ANDREONI, C.; ORSI, G.; DE MARIA, C.; MONTEMURRO, F. In Silico Models for Dynamic Connected Cell Cultures Mimicking Hepatocyte-Endothelial Cell-Adipocyte Interaction Circle. **PLoS one**, 9(2), e111946, 2014.

BAERT, K.; VALERO, A.; DE MEULENAER, B.; SAMAPUNDO, S.; AHMED, M.M.; BO, L.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. **International Journal of Food Microbiology**, 118(3-4), 139-150, 2007.

BARANYI, J. Stochastic modelling of bacterial lag phase. **International Journal of food microbiology**, 3(2), 203-206, 2002.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International journal of food microbiology**, 23(3-4), 277-294, 1994.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **International journal of food microbiology**, 26(2), 199-218, 1995.

BARANYI, J.; PIN, C. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. **Applied and environmental microbiology**, 65(2), 732-736, 1999.

BASHEER, I.A.; HAJMEER, M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. **Journal of Microbiological Methods**, 43(1), 3-31, 2000.

BELDA-GALBIS, C.M.; PINA-PÉREZ, M.C.; ESPINOSA, J.; MARCO-CELDRÁN, A.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. Use of the modified Gompertz equation to assess the *Stevia rebaudiana* Bertoni antilisterial kinetics. **Food microbiology**, 38, 56-61, 2014.

BRADEN, C.R.; TAUXE, R.V. Emerging trends in foodborne diseases. **Infectious disease clinics of North America**, 27(3), 517-533, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Transmitidas Por Alimentos**. Brasília: [s.n.], 2014.

BRUCKNER, S.; ALBRECHT, A.; PETERSEN, B.; KREYENSCHMIDT, J. A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. **Food Control**, 29(2), 451-460, 2013.

BUCHANAN, R.E. Life Phases. **The Journal of Infectious Diseases**, 23(2), 109-125, 1918.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (EUA). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 1996-2012. **Morbidity and mortality weekly report (MMWR)**, Washington, 62(15), 283, 2013.

CHANG, Yu-Hao; HO, Wen-Hsien; SHI, Hon-Yi; CHOU, Jyh-Horng. Prediction and sensitivity analysis by TS fuzzy neural network for fungal growth in food products. In: **System Science and Engineering (ICSSE), 2013 International Conference on**. IEEE, 2013. 41-44.

CHATTERJEE, T.; CHATTERJEE, B. K.; MAJUMDAR, D.; CHAKRABARTI, P. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1850(2), 299-306, 2015.

DAYNAC, M; CORTES-CABRERA, A; PRIETO, J.M. Application of artificial intelligence to the prediction of the antimicrobial activity of essential oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015, 2015.

DELHALLE, L.; DAUBE, G.; ADOLPHE, Y.; CREVECOEUR, S.; CLINQUART, A. Laurent. Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, 13(3), 369-381, 2012.

DUAN, Z; HANSEN, T.H; HANSEN, T.B; DALGARD, P; KNØCHEL, S. Predicting outgrowth and inactivation of *Clostridium perfringens* in meat products during low temperature long time heat treatment. **International journal of food microbiology**, 230, 45-57, 2016.

EDELSTEIN, S. Food Science: an Ecological Approach. Burlington (EUA): **Jones & Bartlett Publishers**, 2013. 554p.

ESSER, D.S.; LEVEAU, J.H.J.; MEYER, K.M. Modeling microbial growth and dynamics. **Applied microbiology and biotechnology**, 99(21), 8831-8846, 2015.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R.M.; MANNAN, K.S.B. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. **Ceylon Journal of Science**, Bangladesh, 40(2), 121-131, 2011.

FUNES, E.; ALLOUCHE, Y; BELTRÁN, G. A review: Artificial Neural Networks as Tool for Control Food Industry Process. **Journal of Sensor Technology**, 5(1), 28-43, 2015.

GARRE, A.; FERNÁNDEZ, P.S.; LINDQVIST, R.; EGEA, J.A. Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. **Food Research International**, 93, 66-74, 2017.

GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International journal of food microbiology*, 6(2), 155-178, 1988.

GINSON, J; PANDA, S.K; BINDU, J; KAMALAKANTH, C. K.; GOPAL, S. Effect of high pressure treatment on microbiological quality of Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*) during chilled storage. **Food microbiology**, 46, 596-603, 2015.

GOEL, N.S.; RICHTER-DYN, N. **Stochastic Models in Biology**. Nova Iorque: Elsevier, 2016. 282p. p.

GOSUKONDA, R.; MAHAPATRA, A.K.; LIU, X.; KANNAN, G. Application of artificial neural networks to predict *Escherichia coli* 157:H7 inactivation on beef surfaces. **Food Control**, 47, 606-614, 2015.

HALL, B. G.; ACAR, H.; NANDIPATI, A.; BARLOW, M. Growth Rates Made Easy. **Molecular biology and evolution**, 31(1), 232-238, 2014.

HUANG, L. IPMP 2013: a comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. **International journal of food microbiology**, 171, 100-107, 2014.

JOSHI, G. Review of Genetic Algorithm: An Optimization Technique. **International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering**, 4(4), 802-805, 2014.

KIRK, M.D; PIRES, S.M.; BLACK, R.E.; CAIPO, M; CRUMP, J.A.; DEVLEESSCHAUWER, B; FAZIL, D.A; FISHER-WALKER, C.L.; HALD, T; HALL, A.J.; KEDDY, K.H.; LAKE, R.J.; LANATA, C.F.; TORGERSON, P.R.; HAVELAAR, A.H.; ANGULO, F.J. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. **PLoS medicine**, 12(12), e1001921, 2015.

KOUTSOUMANIS, K.P.; ASPRIDOU, Z. Individual cell heterogeneity in Predictive Food Microbiology: Challenges in predicting a “noisy” world. **International Journal of Food Microbiology**, 240, 3-10, 2017

KOWALIK, J; LOBACZ, A. Development of a predictive model describing the growth of *Yersinia enterocolitica* in Camembert-type cheese. **International Journal of Food Science & Technology**, 50(3), 811-818, 2015.

LEIGHTY, R.W.; ANTONIEWICZ, M.R. Dynamic metabolic flux analysis (DMFA): A framework for determining. **Metabolic engineering**, 13(6), 745-755, 2011.

LONGHI, D.A; CARFIOCI, B.A.M.; LAURINDO, J.B.; ARAGÃO, G. M.F.D &. Modeling the growth of *Byssoschlamys fulva* on solidified apple juice at different temperatures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57(6), 971-978, 2014.

MAHADEVAN, R.; EDWARDS, J.S.; DOYLE, F.J. Dynamic Flux Balance Analysis of Diauxic Growth in *Escherichia coli*. **Biophysical Journal**, 83(3), 1331-1340, 2002.

MCMEEKIN, T.A.; OLLEY, J.; ROSS, T. **Predictive microbiology: theory and application**. 1. ed. Taunton (Reino Unido): Research Studies Press, 1993. 340p.

MEDINA, A.; LAMBERT, R.J.W.; MAGAN, N. Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: a tool for screening antifungal compounds. **Fungal Biology**, 116(1), 161-169, 2012.

MEJLHOLM, O.; BØKNÆS, N.; DALGAARD, P. Development and validation of a stochastic model for potential growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated lightly preserved seafood. **Food Microbiology**, 45, 276-289, 2015.

MØLLER, C.O.A.; ILG, Y.; AABO, S.; CHRISTENSE, B.B.; DALGAARD, P.; HANSEN, T.B. Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella spp.* in fresh pork—a predictive microbiology approach. **Food microbiology**, 34(2) 284-295, 2013.

NIMMEGEERS, P.; VERCAMMEN, D.; LOGIST, F.; VAN IMPE, J.F.M. **Dynamic metabolic flux analysis in metabolic networks: a non-linear dynamic optimization approach**. Book of Abstracts 34th Benelux Meeting on Systems and Control. Lommel, Bélgica: [s.n.]. 2015.

OLADUNJOYE, A.O.; STANLEY, A.O.; SINGH, S.; IJABADENIYI, O.A. Prediction of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 growth on fresh-cut produce treated with bacteriophage and sucrose monolaurate by using artificial neural network. **LWT-Food Science and Technology**, 76, 9-17, 2017.

PEARL, R. The growth of populations. **The Quarterly Review of Biology**, 2(4), 532-548, dec 1927.

- PEREZ-RODRIGUEZ, F.; VALERO, A. **Predictive microbiology in foods**. Nova Iorque: Springer, 2013. 128 p.
- PLA, M.L, OLTRA, S; ESTEBÁN, M.D; ANDREU, S; PALOP, A. Comparison of primary models to predict microbial growth by the plate count and absorbance methods. **BioMed research international**, 015, 2015.
- RATKOWSKY, D.A.; LOWRY, R.K.; MCMEEKIN, T.A.; STOKES, A.N.; CHANDLER, R.E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, 154(3), 1222-1226, 1983.
- RATKOWSKY, D.A.; REDDY, G.VP. Empirical model with excellent statistical properties for describing temperature-dependent developmental rates of insects and mites. **Annals of the Entomological Society of America**, 110(3) 302-309, 2017.
- ROSSO, L.; LOBRY, J.R.; FLANDROIS, J.P. An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. **Journal of Theoretical Biology**, 162(4), 447-463, 1993.
- SCHELEGUEDA, L.I; ZALADAR, A.L; HRACEK, V.M; GLIEMMO, M.F; CAMPOS, C.A. Effect of steviosides and potassium sorbate on the growth and thermal inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified model aqueous systems. **LWT-Food Science and Technology**, 9, 659-663, 2017.
- SILVA, P.S. **Estudo da cinética de crescimento de *Byssoschlamys fulva* em polpa de mamão: uma abordagem integrada com fenômenos de transferência de calor**. 2013. 214 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2013.
- SIQUEIRA, A.A.; DE CARVALHO, P.G.S.; MENDES, M.L.M.; SHIOSAKI, R.K. MicroFit: a free software for the development and fit of mathematical models for bacterial growth. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, 17(4), 329-339, 2014.
- STAMATI, I.; LOGIST, F.; AKKERMANS, S.; FERNÁNDEZ, N.; VAN IMPE, J. On the effect of sampling rate and experimental noise in the discrimination between microbial growth models in the suboptimal temperature range. **Computers & Chemical Engineering**, 85, 84-93, 2016.
- STUKALIN, E.B.; AIFUWA, I.; KIM, J.S.; WIRTZ, D.; SUN, S.X.. Age-dependent stochastic models for understanding fluctuations in continuously cultured cells. **Journal of the royal society interface**, 10(85), 20130325, 2013.
- SUBRAMANIAM, P; WAREING, P. **The Stability and Shelf Life of Food**. 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016. 612 p.
- TENENHAUS-AZIZA, F; ELLOUZE, M. Software for predictive microbiology and risk assessment: a description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. **Food microbiology**, 45, 290-299, 2015.
- TORNUK, F.; OZTURK, I.; SAGDIC, O.; YILMAZ, A.; ERKMEN, O. Application of predictive inactivation model to evaluate survival of *Staphylococcus aureus* in fresh-cut apples treated with different plant hydrosols. **International Journal of Food Properties**, 17(3), 587 - 598, 2014.
- TREMARIN, A.; LONGHI, D.A.; SALOMÃO, B.C.M.; ARAGÃO, G.M.F. **Mathematical modeling for *Neosartorya fischeri* growth under non-isothermal conditions**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis: [s.n.]. 2015.
- TSIRONI, T; DERMESONLOUGLOU, E; GIANNOGLOU, M; GOGOU, E; KATSAROS, G; TAOUKIS, P. Shelf-life prediction models for ready-to-eat fresh cut salads: Testing in real cold chain. **International Journal of Food Microbiology**, 240, 131-140, 2017.

VAN HECK, R.G.A.; GANTER, M.; DOS SANTOS, V.A.P.; STELLING, J. Efficient reconstruction of predictive consensus metabolic network models. **PLoS Comput Biol**, 12(8), e1005085, 2016.

VAN IMPE, J.F.; VERCAMMEN, D.; VAN DERLINDEN, E. Toward a next generation of predictive models: a systems biology primer. **Food Control**, 29(2), 336-342, 2013.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R. L. **A classification of models in predictive microbiology e reply**, 10(2), 175-177, 1993.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, 56(6), 1875-1881, 1990.