

Daniel Angelo Longhi

**DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ÓTIMO PARA A  
ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DO  
CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* EM  
CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos.

Orientador: Dr. João B. Laurindo

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Gláucia. M. F. de Aragão

Coorientador: Dr. Bruno A. M. Carciofi

Florianópolis/SC

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Longhi, Daniel Angelo  
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ÓTIMO PARA A ESTIMATIVA DOS  
PARÂMETROS DO CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* EM  
CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS / Daniel Angelo Longhi ;  
orientador, João Borges Laurindo ; coorientadora, Gláucia  
Maria Falcão de Aragão, coorientador, Bruno Augusto Mattar  
Carciofi. - Florianópolis, SC, 2016.  
133 p.

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

Inclui referências

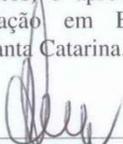
1. Engenharia de Alimentos. 2. microbiologia preditiva.  
3. modelagem matemática. 4. crescimento microbiano. 5.  
presunto. I. Laurindo, João Borges. II. Aragão, Gláucia  
Maria Falcão de. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos. IV. Título.

**“DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ÓTIMO PARA A ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DO CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* EM CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS”**

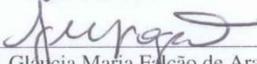
Por

**Daniel Angelo Longhi**

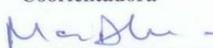
Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Borges Laurindo

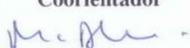
**Orientador**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

**Coorientadora**

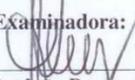
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

**Coorientador**

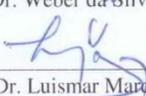
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Di Luccio

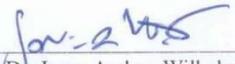
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

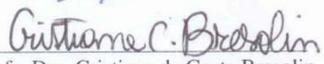
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Borges Laurindo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Weber da Silva Robazza

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luisimar Marques Porto

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Andrey Wilhelms Gut

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cristiane da Costa Bresolin

**Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016.**



Dedico esta tese a todos que  
contribuíram para que ela se tornasse  
possível



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e proteção para que eu pudesse superar todos os obstáculos.

A minha mãe Zélia, por desempenhar de forma exemplar seu papel de mãe e de avó, por me ensinar educação, justiça, respeito e humildade, por me conceder a vida, por ter doado um de seus rins e pelo amor incondicional, jamais enfraquecido pela distância.

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

Aos meus irmãos João Ricardo e André, por terem me ensinado a ser forte e não desistir nunca, por serem referência no meu desenvolvimento e por me apoiarem sempre.

A minha esposa Heidy, por me apoiar sempre com muito amor, paciência, atenção e alegria, e a toda sua família, por terem me acolhido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João, e aos meus coorientadores, Prof. Dra. Gláucia e Prof. Dr. Bruno, por todos os ensinamentos e incentivos, pela paciência e dedicação e, sobretudo, pelos exemplos de profissionalismo e competência.

Ao Prof. Dr. Jorge Andrey Wilhelms Gut, Prof. Dr. Weber da Silva Robazza, Prof. Dr. Agenor Furigo Junior, Prof. Dr. Luismar Marques Porto, Prof. Dr. Marco di Luccio e Prof. Dra. Cristiane da Costa Bresolin, pela disponibilidade em fazer parte da banca da qualificação e tese, com contribuições valiosas.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação, do Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (Profi) e do Laboratório de Engenharia Bioquímica (EngeBio), por todos os momentos intensos de estudo e de descontração, desde o início do mestrado até o término do doutorado, dentro e fora da universidade.

Ao amigo Jhony, pela grande amizade de longa data e pelas discussões que contribuíram no desenvolvimento desta tese, aos amigos Ana Paula, Nathália e Wiaslan, por terem conduzido experimentos impecáveis que contribuíram muito com esta tese, e as amigas Andréia, Morgana e Francieli, pelas parcerias incríveis que resultaram em publicações científicas.

Aos amigos professores da Universidade Federal do Paraná, pelo acolhimento e auxílio no desenvolvimento das atividades de professor do ensino superior e coordenador de curso de graduação, e por todo o apoio na reta final desta tese de doutorado.

Aos médicos nefrologistas Moschetta, Geraldo, Denizard, Luiz Eduardo e suas equipes, por todo o zelo na manutenção da minha saúde.

A todas as pessoas que acreditaram e contribuíram na realização desta tese.

Aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, por todos os ensinamentos e oportunidades oferecidas ao longo do mestrado e doutorado, e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

*“Investir em conhecimento rende sempre os melhores juros”*

(Benjamin Franklin)

*“Decidi não esperar as oportunidades e sim, buscá-las”*

(Walt Disney)

*“Você nunca sabe a força que tem, até que a sua única alternativa é ser forte”*

(Johnny Depp)



## RESUMO

A bactéria ácido-láctica *Weissella viridescens* tem sido indicada como um dos principais micro-organismos deteriorantes de produtos cárneos. O crescimento de micro-organismos sob condições isotérmicas ou não-isotérmicas pode ser descrito por modelos matemáticos, cujos parâmetros são estimados com base em dados experimentais de crescimento, com valores que dependem da abordagem utilizada na estimativa. Na Modelagem em Duas Etapas (MDE), o ajuste dos modelos primário e secundário é sequencial e tem como base experimentos em condições isotérmicas, sendo esta a abordagem mais reportada na literatura. No entanto, os parâmetros dos modelos podem ser estimados simultaneamente com a Modelagem em Uma Etapa (MUE), com experimentos em condições isotérmicas ou não-isotérmicas. Para reduzir o tempo experimental, a quantidade e o custo de dados experimentais, e a incerteza dos parâmetros (intervalos de confiança), os experimentos em condições não-isotérmicas podem ser otimizados com o Delineamento Experimental Ótimo (DEO). Para isso, matrizes que quantificam a sensibilidade das respostas dos modelos em relação às variações nos valores dos parâmetros são otimizadas. O objetivo desta tese de doutorado foi aplicar o DEO para estimar os parâmetros do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo e em presunto, com menores tempos, quantidade de dados experimentais e redução da incerteza dos parâmetros, quando comparado às abordagens MDE e MUE. Os experimentos para a estimativa dos parâmetros foram realizados em meio de cultivo em seis condições isotérmicas (para a MDE e MUE em condições isotérmicas,  $MUE_{iso}$ ); em quatro condições não-isotérmicas não-ótimas (para a MUE em condições não-isotérmicas,  $MUE_{nao}$ ); e em quatro condições não-isotérmicas delineadas de forma ótima (para o DEO). Um experimento adicional delineado de forma ótima foi utilizado para a validação dos parâmetros. Os experimentos nas cinco condições não-isotérmicas ótimas foram realizados também em presunto ( $DEO_{pres}$ ) para a estimativa dos parâmetros e validação. O modelo primário de Baranyi e Roberts e o modelo secundário da Raiz Quadrada foram utilizados para descrever o crescimento microbiano. Índices estatísticos foram utilizados para avaliar a qualidade dos ajustes dos modelos aos dados e a capacidade preditiva dos modelos. Em meio de cultivo, os parâmetros estimados com a MDE, a  $MUE_{iso}$  e o DEO foram próximos uns dos outros, sendo que as incertezas dos parâmetros foram menores com a  $MUE_{iso}$  e similares com a MDE e DEO. Entretanto, houve uma

grande redução na quantidade de dados e tempo experimental necessários para estimar os parâmetros, de 196 dados e 3.540 horas na MDE e MUE<sub>iso</sub> para 60 dados e 588 horas no DEO. Além disso, os modelos resultantes do DEO apresentaram as melhores previsões. Os parâmetros estimados na MUE<sub>nao</sub> foram distintos dos demais, com maiores incertezas, e os ajustes dos modelos resultaram em índices estatísticos insatisfatórios. O DEO foi utilizado também com sucesso na estimativa dos parâmetros de crescimento de *W. viridescens* em presunto. Os parâmetros estimados em presunto com DEO apresentaram incerteza similar aos parâmetros estimados em meio de cultivo, e os índices estatísticos confirmaram o bom ajuste dos modelos aos dados experimentais. Os modelos com os parâmetros estimados com o DEO<sub>pres</sub> apresentaram previsões satisfatórias do crescimento microbiano também em presunto. Portanto, os resultados desta tese apontam que o DEO pode ser utilizado com sucesso para estimar os parâmetros do crescimento microbiano em meio de cultivo e em presunto, resultando em modelos com boa capacidade preditiva. Além disso, os parâmetros podem ser estimados com menores tempos e quantidade de dados experimentais, e menores incertezas dos parâmetros quando comparado às abordagens MDE e MUE.

**Palavras-chave:** microbiologia preditiva, modelagem matemática, crescimento microbiano, presunto.

## ABSTRACT

The acid-lactic bacteria *Weissella viridescens* has been indicated as one of the main spoilage microorganisms of meat products. The microbial growth under isothermal or non-isothermal conditions can be described by mathematical models, which parameters are estimated based on growth experimental data, with values that depend on the approach used in the estimation. In the Modeling in Two Step (MTS), the fitting of primary and secondary models is sequential, and has as base experiment under isothermal conditions, being the approach most reported in the literature. However, the parameters of the models can be estimated simultaneously with the Modeling in One Step (MOS) with experiments in isothermal or non-isothermal conditions. To reduce the experimental time, quantity and cost of experimental data, and the uncertainty of the parameters (confidence intervals), the experiments in non-isothermal conditions can be optimized with Optimal Experimental Design (OED). To do that, matrices which quantify the sensitivity of the model responses to the variations in the values of the parameters are optimized. The objective of this doctoral thesis was applying the OED to estimate the growth parameters of *W. viridescens* in culture medium and ham with lower time, quantity of experimental data and reduction of parameter uncertainty when compared to MTS and MOS approaches. The experiments for the parameter estimation were performed in culture medium in six isothermal conditions (for MTS and MOS in isothermal conditions,  $MOS_{iso}$ ), in four non-optimal non-isothermal conditions (for MOS in non-isothermal conditions,  $MOS_{non}$ ), and in four optimal non-isothermal conditions (for OED). One additional experiment optimally designed was used for the validation of the parameters. The experiments in the five optimal non-isothermal conditions were also performed in ham ( $OED_{ham}$ ) for the estimation of the parameters and validation. The Baranyi and Roberts primary model and the Square Root secondary model were used to describe the microbial growth. Statistical indexes were used to assess the quality of the model fitting to the data and the predictive ability of the models. In culture medium, the parameters estimated with the MTS, the  $MOS_{iso}$  and the OED were near each other, in which the uncertainty of the parameters were lower with the MOS and similar with the MTS and OED. However, there were a great reduction in the quantity of data and experimental time needed to estimate the parameters, from 196 data and 3,540 hours in MTS and  $MOS_{iso}$  to 60 data and 588 hours in OED. Furthermore, the models resulting of OED presented the greatest

predictions. The parameters estimated in  $MOS_{non}$  were distinct from others, with greater uncertainty, and the model fitting resulted in unsatisfying statistical indexes. The OED was also used successfully in the estimation of the growth parameters of *W. viridescens* in ham. The parameters estimated in ham with OED presented similar uncertainty to the parameters estimated in culture medium, and the statistical indexes confirmed the good fitting of the models to the experimental data. The models with the parameters estimated with the  $OED_{ham}$  presented satisfactory predictions of the microbial growth also in ham. Therefore, the results of this thesis point out that the OED can be successfully used to estimate the microbial growth parameters in culture medium and in ham, resulting in models with good predictive ability. Furthermore, the parameters can be estimated with lower time and quantity of experimental data, and lower uncertainty of parameters when compared to the MTS and MOS approaches.

**Keywords:** predictive microbiology, mathematical modeling, microbial growth, ham.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Curva típica do crescimento microbiano em condições ambientais constantes (linha contínua) e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento (linha tracejada) em relação ao tempo. ....	40
Figura 2.2 – Dados experimentais (símbolos), perfil de temperatura (linha tracejada) e predição do crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em leite pasteurizado em condições não-isotérmicas (linha contínua). ....	42
Figura 2.3 – Procedimento baseado em técnicas de delineamento experimental ótimo para a estimativa de parâmetros e validação de modelos matemáticos. ....	54
Figura 2.4 – Interpretação geométrica dos critérios de otimização A-, D- e E- na estimativa dos parâmetros $\theta_1$ e $\theta_2$ . ....	57
Figura 2.5 – MDE utilizado na estimativa dos parâmetros de crescimento de <i>Pseudomonas spp.</i> em carne de frango. À esquerda: ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts (primeira etapa); à direita: ajuste do modelo secundário da Raiz Quadrada (segunda etapa). ....	58
Figura 2.6 – Restrições e graus de liberdade para o delineamento ótimo de experimentos. ....	62
Figura 4.1 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo (símbolos) a (a) 4, 8, 12 °C, e a (b) 16, 20 e 30 °C; ajuste do modelo de Baranyi e Roberts obtidos na MDE (linhas contínuas) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas). ....	78
Figura 4.2 – Valores do parâmetro $\mu_{max}$ (círculos) estimados pelo modelo de Baranyi e Roberts, ajuste do modelo da Raiz Quadrada (linha contínua) e intervalos de predição a 95% (linha tracejada). ....	80
Figura 4.3 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo (símbolos) a (a) 4, 8, 12 °C, e a (b) 16, 20 e 30 °C, ajuste do modelo de Baranyi e Roberts obtidos na MUE <sub>iso</sub> (linhas contínuas) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas). ....	82
Figura 4.4 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para NOT <sub>5-11(24h)</sub> : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas). ....	83
Figura 4.5 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para NOT <sub>5-11(12h)</sub> : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas). ....	83

Figura 4.6 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para NOT <sub>5-8(12h)</sub> : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas). .....	84
Figura 4.7 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para NOT <sub>3-10(12h)</sub> : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas). .....	84
Figura 4.8 – Perfil DEO <sub>4-8-12-16</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos selecionados para coleta dos dados experimentais (símbolos). 88	
Figura 4.9 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> para o perfil DEO <sub>4-8-12-16</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).88	
Figura 4.10 – Perfil DEO <sub>12-16-20-25</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos selecionados para coleta dos dados experimentais (símbolos). 89	
Figura 4.11 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> para o perfil DEO <sub>12-16-20-25</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).89	
Figura 4.12 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> para os perfis DEO <sub>4-8-12-16</sub> e DEO <sub>12-16-20-25</sub> , perfis de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas). .....	90
Figura 4.13 – Perfil DEO <sub>16-12-8-4</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos selecionados para coleta dos dados experimentais (símbolos). 92	
Figura 4.14 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> para o perfil DEO <sub>16-12-8-4</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).92	
Figura 4.15 – Perfil DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos selecionados para coleta dos dados experimentais (símbolos). 93	

Figura 4.16 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> para o perfil DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).	93
Figura 4.17 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> para os perfis DEO <sub>16-12-8-4</sub> e DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub> , perfil de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).	94
Figura 4.18 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> para os perfis DEO <sub>4-8-12-16</sub> , DEO <sub>12-16-20-25</sub> , DEO <sub>16-12-8-4</sub> e DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub> e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).	95
Figura 4.19 – Dispersão dos valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada para o crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo estimados com as abordagens MDE, MUE <sub>iso</sub> , MUE <sub>nao</sub> , DEO <sub>aum</sub> , DEO <sub>dim</sub> e DEO <sub>aumdim</sub> (símbolos), intervalos de confiança a 95% para as diferentes abordagens a MDE (linhas tracejadas).	99
Figura 4.20 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para o perfil NOT <sub>5-11(24h)</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO <sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).	104
Figura 4.21 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para o perfil NOT <sub>5-11(12h)</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO <sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).	105
Figura 4.22 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para o perfil NOT <sub>5-8(12h)</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO <sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).	105
Figura 4.23 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para o perfil NOT <sub>3-10(12h)</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO <sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).	106

Figura 4.24 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo para o perfil DEO <sub>12-8-4-8-12</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO <sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).....	106
Figura 4.25 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto para o perfil DEO <sub>4-8-12-16-pres</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).....	107
Figura 4.26 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto para o perfil DEO <sub>12-16-20-25-pres</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).....	108
Figura 4.27 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto para os perfis DEO <sub>4-8-12-16-pres</sub> e DEO <sub>12-16-20-25-pres</sub> , perfis de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas). .....	109
Figura 4.28 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto para o perfil DEO <sub>16-12-8-4-pres</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).....	110
Figura 4.29 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto para o perfil DEO <sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub> , perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada). ....	110
Figura 4.30 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto para os perfis DEO <sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO <sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub> , perfis de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas). ....	111
Figura 4.31 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto para os perfis DEO <sub>4-8-12-16-pres</sub> ,	

DEO <sub>12-16-20-25-pres</sub> , DEO <sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO <sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub> e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas). .....	112
Figura 4.32 – Dispersão dos valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada para o crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto estimados com DEO <sub>4-8-12-16-pres</sub> , DEO <sub>12-16-20-25-pres</sub> , DEO <sub>16-12-8-4-pres</sub> , DEO <sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub> , DEO <sub>aum-pres</sub> , DEO <sub>dim-pres</sub> e DEO <sub>aumdim-pres</sub> (símbolos), intervalos de confiança a 95% para os parâmetros com DEO <sub>aum-pres</sub> e DEO <sub>dim-pres</sub> (linhas pontilhadas) e intervalos de confiança a 95% para os parâmetros com DEO <sub>aumdim-pres</sub> (linhas tracejadas).....	115
Figura 4.33 – Dados experimentais do crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada), predições do crescimento com DEO <sub>aum-pres</sub> (linha tracejada), DEO <sub>dim-pres</sub> (linha de traços e pontos) e DEO <sub>aumdim-pres</sub> (linha contínua) para o perfil DEO <sub>12-8-4-8-12</sub> .....	117



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Definição dos platôs de temperatura dos experimentos delineados de forma ótima. ....	67
Tabela 3.2 – Etapas experimentais e de modelagem matemática necessárias para a estimativa de parâmetros em cada abordagem.....	70
Tabela 4.1 – Parâmetros estimados ( $\pm$ intervalos de confiança a 95%) no ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados de crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo com MDE.....	79
Tabela 4.2 – Tempo experimental e quantidade de dados experimentais necessários para a estimativa dos parâmetros dos modelos matemáticos com as abordagens MDE, MUE e DEO em meio de cultivo. ....	96
Tabela 4.3 – Valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada ( $\pm$ intervalos de confiança a 95%) e índices estatísticos ( $R^2$ e $RMSE$ ) para as abordagens MDE, MUE e DEO. ....	98
Tabela 4.4 – Valores do parâmetro $\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ ) estimados com a MDE (com repetição) e estimados em cada platô de temperatura (subconjuntos) para os quatro perfis de temperatura delineados de forma ótima (DEO <sub>4-8-12-16</sub> , DEO <sub>12-16-20-25</sub> , DEO <sub>16-12-8-4</sub> e DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub> ).....	101
Tabela 4.5 – Índices estatísticos $RMSE$ , <i>fator tendência</i> e <i>fator exatidão</i> obtidos na validação dos parâmetros estimados com MDE, MUE <sub>iso</sub> e DEO para os perfis NOT <sub>5-11(24h)</sub> , NOT <sub>5-11(12h)</sub> , NOT <sub>5-8(12h)</sub> , NOT <sub>3-10(12h)</sub> e DEO <sub>12-8-4-8-12</sub> .....	103
Tabela 4.6 – Valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada ( $\pm$ intervalos de confiança a 95%) estimados com os diferentes perfis ótimos e índices estatísticos ( $R^2$ e $RMSE$ ) dos ajustes dos modelos matemáticos para o crescimento de <i>W. viridescens</i> em presunto. ....	113
Tabela 7.1 – Valores do parâmetro $h_0$ estimados no ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts aos dados experimentais (repetição: <i>Set 1</i> e <i>2</i> ) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo com os valores de $y_0$ experimental fixo ( $y_{0-fix}$ ) e $y_0$ estimado no ajuste ( $y_{0-est}$ ), e média dos valores de $h_0$ estimados ( $\pm$ desvio padrão). ....	132
Tabela 7.2 – Parâmetros estimados ( $\pm$ intervalos de confiança a 95%) no ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts aos dados experimentais (repetição: <i>Set 1</i> e <i>2</i> ) do crescimento de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo com os valores de $y_0$ experimental fixo ( $y_{0-fix}$ ) e $y_0$ estimado ( $y_{0-est}$ ) no ajuste. ....	133



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Elemento	Descrição	Unidade
<i>Letras Latinas</i>		
AMIGO	<i>Advanced Model Identification using Global Optimization</i>	-
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	-
<i>b</i>	Parâmetro empírico	$h^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$
BD	Busca Dispersa	-
CCT	Coleção de Culturas Tropicais	-
DEO	Delineamento Experimental Ótimo	-
<i>F</i>	Função do modelo de Baranyi e Roberts	h
GRG	Gradientes Reduzidos Generalizados	-
<i>h</i>	Função de transformação do parâmetro <i>q</i>	adimensional
<i>IC</i>	Intervalo de confiança	-
<i>IP</i>	Intervalo de predição	-
<i>J</i>	Função objetivo	-
<i>m</i>	Fator de curvatura	adimensional
MC	Análise de Monte Carlo	-
MDE	Modelagem em Duas Etapas	-
<i>MIF</i>	Matriz de Informação de Fisher	-
MRS	Man, Rugosa and Sharpe	-
MUE	Modelagem em Uma Etapa	-
NLP	Programação não-linear	-
NOT	Não ótimo	-
<i>num</i>	Número de dados observados	adimensional
<i>N</i>	Concentração microbiana	UFC/mL ou UFC/g
<i>par</i>	Vetor dos valores dos parâmetros	-
<i>q</i>	Função da substância crítica <i>v</i>	adimensional
<i>Q</i>	Função logarítmica da substância crítica <i>v</i>	adimensional
$R^2$	Coefficiente de determinação	-
<i>S</i>	Vetor dos elementos da diagonal da matriz de covariância estimada dos parâmetros	-
<i>RMSE</i>	Raiz quadrada do erro quadrático médio	-
$s^2$	Erro quadrático médio	-
<i>SSE</i>	Somatório da diferença quadrática entre $y_{obs}$ e $y_{pdt}$	adimensional

<i>SSm</i>	<i>Scatter Search matlab</i>	-
<i>SST</i>	Somatório da diferença quadrática entre $y_{pdt}$ e $\overline{y_{obs}}$	adimensional
<i>t</i>	Tempo	h
<i>tn</i>	Escalar calculado usando o inverso da função da distribuição cumulativa <i>t</i> de Student	adimensional
<i>T</i>	Temperatura	°C
UFC	Unidade Formadora de Colônias	-
<i>v</i>	Substância crítica	-
<i>W</i>	Matriz de ponderação	-
<i>x</i>	Jacobiana avaliada nos valores preditos	-
<i>X</i>	Jacobiana dos valores ajustados em relação aos parâmetros	-
<i>y</i>	Logaritmo natural da concentração microbiana	-

---

*Letras Gregas*

---

<i>α</i>	Função de ajuste – estado fisiológico das células	-
<i>Δ</i>	Variação	-
<i>Λ</i>	Critério de otimização	-
<i>λ</i>	Fase de adaptação inicial	h
<i>μ</i>	Velocidade específica de crescimento	h <sup>-1</sup>
<i>σ</i>	Desvio padrão	-
<i>τ</i>	Autovalor da matriz	-

---

*Subscritos e sobrescritos*

---

-1	Inversa	-
0	Inicial	-
<i>d</i>	Duplicação	-
<i>end</i>	Final	-
<i>est</i>	Estacionário	-
<i>exp</i>	Exponencial	-
<i>i</i>	Contador de números naturais	-
iso	Condições isotérmicas	-
<i>lag</i>	Adaptação	-
<i>max</i>	Máximo	-
<i>min</i>	Mínimo	-
n	Enésimo número	-
nao	Condições não-isotérmicas	-
<i>opt</i>	Ótimo	-

<i>obs</i>	Observado	-
<i>pdt</i>	Predito	-
<i>pres</i>	Presunto	-
<i>shift</i>	Mudança	-
T	Transposta	-
<hr/> <i>Operações matemáticas</i> <hr/>		
$y(x)$	Função $y$ no elemento $x$	-
$a^b$	Potência de $b$ no elemento $a$	-
$\bar{a}$	Média aritmética dos valores de $a$	-
$\sum_{i=1}^{num} x_i$	Somatório dos $num$ elementos $x$	-
$\int_a^b y(x)dx$	Integral da função $y(x)$ em $x$ de $a$ até $b$	-
$\ln(x)$	Função logarítmica natural de $x$	-
$\log(x)$	Função logarítmica decimal de $x$	-
$\exp(x)$	Função exponencial de $x$	-
$dx/dt$	Derivada de $x$ em relação a $t$	-
$\partial x/\partial t$	Derivada parcial de $x$ em relação a $t$	-



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
1.1	OBJETIVOS.....	33
1.1.1	Objetivo geral .....	33
1.1.2	Objetivos específicos.....	34
1.2	DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO .....	35
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
2.1	DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS POR MICRO-ORGANISMOS.....	37
2.2	CINÉTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS .....	39
2.2.1	Creascimento microbiano em condições ambientais constantes ..	39
2.2.2	Creascimento microbiano em condições não-isotérmicas.....	41
2.3	MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS .....	43
2.3.1	Modelo primário de Baranyi e Roberts .....	44
2.3.2	Modelo secundário da Raiz Quadrada.....	47
2.3.3	Análises estatísticas .....	48
2.3.4	Algoritmos para a estimativa dos parâmetros de modelos não-lineares.....	50
2.4	ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA O CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS .....	51
2.4.1	Modelagem em Duas Etapas (MDE).....	51
2.4.2	Modelagem em Uma Etapa (MUE).....	53
2.4.3	Delineamento Experimental Ótimo (DEO) .....	53
2.5	O ESTADO DA ARTE DAS ABORDAGENS NA LITERATURA .....	57
2.5.1	Modelagem em Duas Etapas (MDE).....	57
2.5.2	Modelagem em Uma Etapa (MUE).....	58
2.5.3	Delineamento Experimental Ótimo (DEO) .....	59

2.6	POSSÍVEIS CONTRIBUIÇÕES DESTA TESE .....	64
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1	DADOS EXPERIMENTAIS DO CRESCIMENTO DE <i>W. viridescens</i> .....	65
3.1.1	Micro-organismo e meios de cultivo.....	65
3.1.2	Condições isotérmicas.....	66
3.1.3	Condições não-isotérmicas.....	66
3.2	MODELOS MATEMÁTICOS .....	69
3.3	MÉTODOS MATEMÁTICOS PARA A ESTIMATIVA DE PARÂMETROS .....	69
3.3.1	Estimativa de parâmetros com MDE.....	69
3.3.2	Estimativa de parâmetros com MUE para dados isotérmicos (MUE <sub>iso</sub> ) e para dados não-isotérmicos (MUE <sub>nao</sub> ) .....	70
3.3.3	Análise de Monte Carlo.....	71
3.3.4	Estimativa de parâmetros com DEO .....	72
3.3.5	Validação dos parâmetros estimados .....	75
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS DADOS EXPERIMENTAIS .....	77
4.2	PARÂMETROS ESTIMADOS COM MDE EM MEIO DE CULTIVO .....	77
4.3	PARÂMETROS ESTIMADOS COM MUE <sub>iso</sub> E MUE <sub>nao</sub> EM MEIO DE CULTIVO.....	81
4.4	PARÂMETROS ESTIMADOS COM DEO EM MEIO DE CULTIVO .....	85
4.4.1	Simulações preliminares – Análise de Monte Carlo .....	85
4.4.2	Resultados obtidos no DEO em meio de cultivo.....	86
4.5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM MEIO DE CULTIVO .....	95
4.6	VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS EM MEIO DE CULTIVO .....	101
4.7	PARÂMETROS ESTIMADOS COM DEO EM PRESUNTO	107

4.8	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM PRESUNTO E VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS ESTIMADOS .....	112
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>119</b>
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	120
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>131</b>



# 1 INTRODUÇÃO

A temperatura de alimentos refrigerados normalmente varia muito durante o transporte, no varejo e, principalmente, nos domicílios, sendo que essas variações influenciam muito a cinética do crescimento microbiano em alimentos. O aumento da temperatura provoca a diminuição da fase de adaptação e o aumento da velocidade específica de crescimento dos micro-organismos deteriorantes de alimentos, principalmente quando temperaturas acima das temperaturas recomendadas para a refrigeração do alimento são alcançadas, o que pode levar a efeitos negativos, como o comprometimento da inocuidade dos alimentos.

A deterioração de carne *in natura* e produtos cárneos, desde a produção até o consumo, tem sido associada ao crescimento de bactérias ácido-láticas, sendo que bactérias do gênero *Lactobacillus* são indicadas como uma das principais agentes da deterioração. *Lactobacillus viridescens*, enquadrada no gene *Weissella* em 1993 e agora denominada *Weissella viridescens*, é uma das bactérias ácido-láticas que tem sido reportada como agente específico da deterioração de produtos cárneos que, em geral, apresenta um tempo de adaptação menor e uma velocidade específica de crescimento maior que outras espécies de bactérias ácido-láticas.

Os meios de cultivo têm sido muito utilizados para obter informações sobre o crescimento microbiano em alimentos, como a duração da fase de adaptação e a velocidade máxima específica de crescimento, porque são mais simples que os alimentos, são mais homogêneos e, além disso, as respostas são mais fáceis de serem interpretadas. O crescimento microbiano observado em meio de cultivo fornece uma estimativa conservadora do crescimento no alimento. Uma abordagem muito usada na literatura é a realização de experimentos tanto em meios de cultivos quanto em alimentos para comparar o crescimento nos diferentes meios.

Os modelos matemáticos construídos com base em conceitos fundamentais a respeito do crescimento microbiano e com o conhecimento de técnicas estatísticas e de programação podem ser ferramentas muito úteis para descrever e prever o crescimento microbiano em alimentos. A microbiologia preditiva, que é o ramo da ciência que trata da utilização de modelos matemáticos para descrever e prever o crescimento microbiano, surgiu no início do século XX, e teve um grande impulso a partir da década de 1980, que foi ocasionado pelo

surgimento dos grandes surtos de doenças transmitidas por alimentos provocadas por contaminação microbiana e também pelo avanço da tecnologia dos computadores. Desde então, vem sendo cada vez mais utilizada por pesquisadores das universidades, institutos de pesquisa e indústrias de alimentos em todo o mundo. Uma grande quantidade de modelos matemáticos tem sido proposta na literatura para descrever o crescimento microbiano. Entretanto, os modelos matemáticos mais empregados são os que apresentam parâmetros em menor quantidade possível e com significado biológico, além da exatidão nas estimativas dos parâmetros e baixa incerteza sobre os parâmetros estimados.

Na microbiologia preditiva, os modelos matemáticos utilizados para representar a curva de crescimento microbiano em função do tempo, para um único conjunto de condições ambientais constantes, são chamados de modelos primários. Os parâmetros dos modelos primários são obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento microbiano em função do tempo. A dependência dos parâmetros do modelo primário em relação a diferentes condições de cultivo, como em função da temperatura, pH ou atividade de água, por exemplo, é descrita por modelos secundários. O modelo primário de Baranyi e Roberts e o modelo secundário da Raiz Quadrada têm sido os modelos mais usados na literatura, sendo que a estimativa dos seus parâmetros ajustáveis pode ser realizada com diferentes abordagens.

A abordagem tradicional de estimativa de parâmetros em microbiologia preditiva é a Modelagem em Duas Etapas (MDE). A primeira etapa é o ajuste do modelo primário aos dados experimentais do crescimento microbiano, em que são estimados os chamados parâmetros primários. Em seguida, os modelos secundários são ajustados aos parâmetros primários para descrever a dependência destes parâmetros aos fatores ambientais. Nessa abordagem, diversos experimentos são conduzidos em diferentes níveis constantes para os fatores que influenciam a cinética microbiana (a temperatura tem sido o fator mais explorado em muitos estudos, por apresentar grande influência sobre o crescimento microbiano). Os dados experimentais obtidos nos diversos experimentos são utilizados para estimar os valores dos parâmetros dos modelos matemáticos. Os parâmetros estimados podem ser validados para a faixa de estudo e para diferentes condições experimentais (níveis constantes ou variáveis). Essa abordagem tem sido aceita na literatura e é muito usada por apresentar algumas facilidades, como a simplificação da execução de experimentos, a obtenção e a interpretação dos resultados; entretanto, o alto custo e o tempo experimental longo são algumas das

desvantagens que têm levado os pesquisadores a buscar métodos alternativos para a estimativa de parâmetros.

Uma das abordagens alternativas propostas é a estimativa de parâmetros com a Modelagem em Uma Etapa (MUE), em que os parâmetros dos modelos matemáticos (primário e secundários) são estimados simultaneamente na mesma etapa da modelagem. Nessa abordagem, a dependência dos parâmetros em relação às condições ambientais já está estabelecida nos modelos, e é possível estimar os parâmetros diretamente de experimentos com condições ambientais variáveis (por exemplo, condições não-isotérmicas, MUE<sub>nao</sub>) ou mesmo condições constantes (por exemplo, condições isotérmicas, MUE<sub>iso</sub>). Uma vantagem dessa abordagem é a possibilidade de propor uma dinâmica de mudanças entre diferentes condições ambientais ao longo do experimento, e isso consequentemente promove uma redução do tempo experimental (já que não é necessário realizar vários experimentos isoladamente). Uma das desvantagens dessa abordagem é a incerteza gerada nos valores dos parâmetros dos modelos matemáticos quando a dinâmica do experimento proposto não é adequada, como por exemplo, variações bruscas entre diferentes condições, amostragem ou tempo inadequados, entre outros.

A otimização das condições experimentais pode ser obtida através da abordagem de Delineamento Experimental Ótimo para a Estimativa de Parâmetros (DEO). No DEO são determinados os graus de liberdade e as restrições do sistema em estudo. Então, são estabelecidas as condições experimentais que maximizam as informações do experimento e diminuem a incerteza dos parâmetros estimados. As condições experimentais ótimas são obtidas através da otimização de matrizes que levam em consideração a sensibilidade das respostas do modelo em relação às variações nos valores dos parâmetros. Essa abordagem pode apresentar resultados mais eficientes, reduzindo a incerteza dos parâmetros estimados, o custo e o tempo experimental.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O objetivo desta tese de doutorado é aplicar o DEO para estimar os parâmetros de crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo e em presunto sob condições não-isotérmicas com menor tempo, menor

quantidade de dados experimentais e menor incerteza dos parâmetros quando comparado às abordagens MDE e MUE.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Estimar os parâmetros dos modelos matemáticos (primários e secundários) com a MDE utilizando dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo em condições isotérmicas;
- Estimar os parâmetros dos modelos matemáticos com a  $MUE_{iso}$  utilizando dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo em condições isotérmicas;
- Estimar os parâmetros dos modelos matemáticos com a  $MUE_{nao}$  utilizando dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo em condições não-isotérmicas não ótimas;
- Propor perfis de temperatura não-isotérmicos ótimos com o DEO para estimar os parâmetros do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo e em presunto;
- Estimar os parâmetros dos modelos matemáticos com o DEO para o crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo e em presunto;
- Analisar comparativamente o tempo e a quantidade de dados experimentais necessários para estimar os parâmetros com as diferentes abordagens (MDE, MUE e DEO), bem como a incerteza dos parâmetros estimados (intervalos de confiança) em cada abordagem;

## 1.2 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

### **Delineamento Experimental Ótimo para a estimativa dos parâmetros do crescimento de *Weissella viridescens* em condições não-isotérmicas**

#### **Por que? Para que?**

- A abordagem tradicional de estimativa de parâmetros do crescimento microbiano modelada em duas etapas (MDE) demanda um longo tempo e grande quantidade de dados experimentais, o que resulta em alto custo;
- A estimativa de parâmetros com experimentos não-isotérmicos em uma etapa (MUE) é atrativa, porém os parâmetros estimados podem apresentar grande incerteza se os experimentos não são delineados adequadamente;
- A estimativa de parâmetros com o delineamento experimental ótimo (DEO) pode ser a alternativa mais vantajosa em termos de tempo experimental necessário, custos (quantidade de dados) e incerteza dos parâmetros.

#### **O que já foi feito?**

- A MDE tem sido utilizada desde o início da década de 1980;
- O DEO tem sido utilizado em microbiologia preditiva desde o final da década de 1990, com maior número de trabalhos no início da década de 2000;
- Não foi encontrado na literatura estudo que utiliza o DEO para estimativa de parâmetros do crescimento de micro-organismos deteriorantes de alimentos; os principais trabalhos têm como alvo o crescimento microbiano em biorreatores.

#### **Hipóteses**

- O DEO é uma abordagem vantajosa em relação ao tempo, quantidade de dados e incerteza dos parâmetros para a estimativa de parâmetros do crescimento de micro-organismos deteriorantes de alimentos em relação às outras abordagens.

#### **Método científico**

- Usar dados experimentais de *W. viridescens* em meio de cultivo em condições isotérmicas para estimar os parâmetros com a MDE;
- Usar dados experimentais em condições isotérmicas e não-isotérmicas não ótimas para estimar os parâmetros com a MUE (MUE<sub>iso</sub> e MUE<sub>nao</sub>);
- Delinear perfis de temperatura ótimos, realizar experimentos para obter os dados em meio de cultivo e em presunto, e estimar os parâmetros com o DEO;
- Analisar comparativamente os resultados obtidos com as diferentes abordagens.

#### **Respostas Esperadas**

- Parâmetros do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo estimados com MDE, MUE e DEO, e em presunto com DEO;
- Identificação das vantagens e desvantagens de cada abordagem.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS POR MICRO-ORGANISMOS

Os consumidores estão cada vez mais exigentes por alimentos de alta qualidade, com a expectativa que a qualidade do alimento será mantida a um nível elevado durante o período entre a compra e o consumo. Essas expectativas são consequência não só da exigência principal de que o alimento permaneça seguro, mas também da necessidade de minimizar as alterações indesejáveis na qualidade sensorial. Em geral, as alterações químicas e sensoriais provocadas por micro-organismos são de primordial importância para os produtos de vida útil curta (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000). A deterioração por micro-organismos é a causa mais comum de deterioração de alimentos, sendo que esta pode se manifestar, por exemplo, com aspectos visíveis (limo, colônias), com modificações na textura (degradação de polímeros) ou com aroma e/ou odor indesejável (GRAM et al., 2002).

Os fabricantes de alimentos devem ter meios acessíveis para prever o ponto final da vida útil de um produto num dado conjunto de condições de armazenamento. Os critérios com base nas medidas de concentração de micro-organismos deteriorantes e patogênicos e seus padrões de crescimento populacional são capazes de uma definição relativamente clara, enquanto critérios não microbiológicos são mais difíceis de definir (embora seja possível definir critérios de vida útil com base na composição química definida de compostos, tal como o conteúdo de vitaminas). A definição das características sensoriais desejáveis em um alimento formulado é considerado um problema para muitas empresas, por consequência, as características sensoriais desejáveis após o armazenamento tornam-se ainda mais difíceis (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000).

De maneira geral, a concentração microbiológica total é um indicador pobre do potencial de deterioração, pois muitos dos organismos enumerados não são aptos a se multiplicarem em alimentos e muitos não serão responsáveis pela deterioração. Ao invés de considerar a concentração microbiológica total como indicador de deterioração, a multiplicação de bactérias deteriorantes específicas pode ser analisada, conhecidas como organismos específicos da deterioração (*specific spoilage organisms*). O conceito de organismo específico da deterioração requer que uma ligação seja feita entre a produção quantitativa e

qualitativa de metabólitos (deteriorantes) por um organismo, o impacto destes metabólitos na impressão sensorial, e a multiplicação dos organismos em produtos naturalmente deteriorados (DALGAARD, 1995).

Algumas espécies de bactérias ácido-láticas têm sido apontadas como organismos específicos da deterioração de carne *in natura* e produtos cárneos (BORCH; KANT-MADMANSB; BLIXT, 1991). O principal grupo de bactérias ácido-láticas pertencem ao gênero *Lactobacillus*, que abrange mais de 50 diferentes espécies (TANNOCK, 2004).

As bactérias ácido-láticas são gram-positivas, não formadoras de esporos, fermentativas, crescem em condições anaeróbicas e em uma grande faixa de temperatura que pode variar desde temperaturas ambientes até abaixo de zero (HOLZAPFEL et al., 2001). A principal rota metabólica das bactérias ácido-láticas é a conversão fermentativa de açúcares presentes nas matérias-primas *in natura* em ácido lático, peptídeos antimicrobianos, exopolissacarídeos e uma variedade de outros metabólitos, colaborando no controle de outros micro-organismos indesejáveis no meio, como leveduras (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2012). Portanto, as bactérias ácido-láticas têm sido usadas como culturas iniciadoras de fermentações industriais de matérias-primas que contém açúcares, resultando em uma variedade de produtos alimentícios, e contribuem para a conservação, aroma e textura dos produtos fermentados (HOLZAPFEL et al., 2001). Por outro lado, a limitação de glicose provoca a mudança do metabolismo de *Lactobacillus* spp. e leva a formação de produtos como o ácido acético e o sulfito de hidrogênio. O sulfito de hidrogênio é produzido a partir de cisteína, sendo que nesta reação as bactérias transformam os pigmentos vermelhos da carne (mioglobina) para verde (sulfomioglobina) (BORCH; KANT-MADMANSB; BLIXT, 1991).

*Weissella viridescens*, mencionada como *Lactobacillus viridescens* em 1961 e enquadrada no gene *Weissella* em 1993 (DUSKOVA; KAMENIK; KARPISKOVA, 2013), é uma espécie de bactéria ácido-lática que tem sido reportada como agente específico da deterioração de produtos cárneos, a qual em geral apresenta um tempo de adaptação menor e uma velocidade específica de crescimento maior que outras espécies de bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus* (DALCANTON, 2010).

## 2.2 CINÉTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS

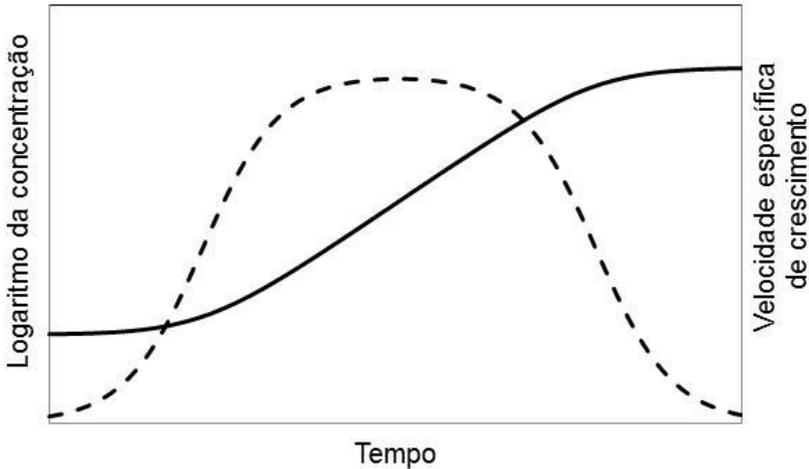
Crescimento microbiano é uma expressão da língua portuguesa que foi traduzida do inglês *microbial growth*, que de forma conceitual significa que a variação temporal do número de células microbianas viáveis no meio analisado é positiva; ou seja, o uso do termo crescimento microbiano significa que a multiplicação de organismos está ocorrendo no meio analisado.

O crescimento microbiano durante o armazenamento de alimentos pode ser afetado por diversos fatores, como a concentração microbiana no início do armazenamento, as propriedades físico-químicas (como pH e atividade de água), o método de processamento usado na produção do alimento e o ambiente externo (como a temperatura e a presença de oxigênio). As interações entre esses fatores podem alterar consideravelmente a cinética do crescimento microbiano (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000). Por isso, o crescimento microbiano em diferentes condições ambientais (constantes ou dinâmicas) deve ser avaliado com cuidado, pois a variação do ambiente pode modificar consideravelmente a cinética do crescimento.

### 2.2.1 Crescimento microbiano em condições ambientais constantes

A curva do crescimento microbiano em condições ambientais constantes normalmente apresenta três fases distintas (fase de adaptação, fase exponencial e fase estacionária), sendo que quando a curva é apresentada através do logaritmo (ou logaritmo natural) da concentração microbiana em função do tempo, as variações da velocidade de crescimento resultam em uma curva do tipo sigmoide (ZWIETERING et al., 1990). Na Figura 2.1 são apresentadas a curva típica sigmoide do crescimento microbiano pelo logaritmo da concentração e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento, ambas em relação ao tempo.

Figura 2.1 – Curva típica do crescimento microbiano em condições ambientais constantes (linha contínua) e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento (linha tracejada) em relação ao tempo.



Fonte: adaptado de Zwietering et al. (1990).

A fase inicial é tipicamente observada como um atraso na resposta dos micro-organismos a uma súbita mudança no ambiente, e esta fase é conhecida como fase de adaptação inicial (ou fase lag, também representada pela letra grega  $\lambda$ ). Esta fase é considerada como o tempo necessário para a adaptação fisiológica dos micro-organismos às condições do novo ambiente em que eles buscam obter as condições necessárias para atingir a velocidade máxima de duplicação (SWINNEN et al., 2004). Esta adaptação pode envolver o tempo requerido para a indução de um mensageiro específico de RNA e para a síntese de proteínas para satisfazer os novos requisitos do ambiente; pode também ocorrer devido às baixas densidades iniciais de organismos (o que resulta na diluição das exo-enzimas) e dos nutrientes que vazam das células em crescimento (normalmente esses materiais são compartilhados por células próximas, mas quando a densidade de células é baixa, estes materiais são diluídos e não são absorvidos com facilidade) (MAIER, 2009).

A vida útil de certos alimentos pode ser relacionada com a duração da fase de adaptação microbiana, pois após este período tem-se início a fase de crescimento exponencial, em que o alimento será deteriorado em um curto tempo. Desta forma, a estimativa da duração da fase de

adaptação tem recebido muita atenção na literatura de microbiologia preditiva (SWINNEN et al., 2004).

Quando o micro-organismo está adaptado ao ambiente se inicia a fase exponencial de crescimento, sendo que é possível observar a aceleração gradual da multiplicação microbiana até que este atinge a sua velocidade máxima de duplicação (conhecida como velocidade máxima específica de crescimento, também representada pela letra grega  $\mu$  com subscrito *max*,  $\mu_{max}$ ). Na fase exponencial de crescimento, o tempo de duplicação (ou tempo de geração,  $t_d$ ) está diretamente relacionado com a velocidade máxima específica de crescimento através da Equação (2.1).

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (2.1)$$

Após certo tempo o micro-organismo perde a capacidade de crescer em velocidade máxima por diversas razões, sendo que dois fatores têm sido reportados como causas principais: a limitação de algum substrato essencial para seu crescimento (principalmente fontes de carbono e energia ou nutrientes essenciais), ou o acúmulo de compostos tóxicos até o ponto em que estes sejam capazes de inibir o crescimento, ou sejam tóxicos para os micro-organismos (isso ocorre apenas nas culturas com densidade de células elevada) (VAN IMPE et al., 2005; MAIER, 2009). Neste momento ocorre um declínio gradual da velocidade de crescimento (desaceleração) e então é atingida a fase estacionária do crescimento, em que o número de micro-organismos gerados na duplicação torna-se igual ao número de micro-organismos que se tornam inativos (ou seja, o crescimento líquido é igual a zero). Na fase estacionária a concentração microbiana é constante ao longo de um determinado tempo.

A fase de declínio do crescimento que ocorre após a fase estacionária, em que o número de micro-organismos gerados na duplicação é menor que o número de micro-organismos que se tornam inativos, não é levada em consideração em microbiologia preditiva de alimentos, pois nessa fase o alimento provavelmente já estará em estado avançado de deterioração.

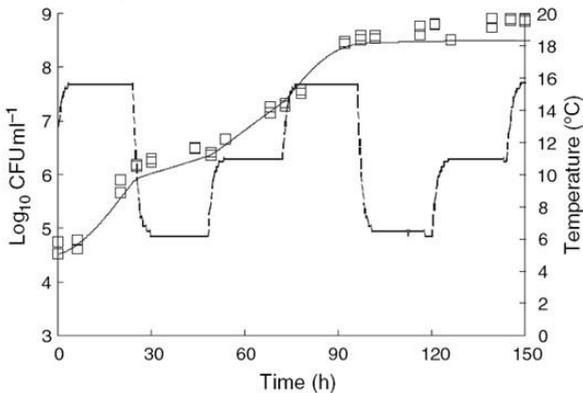
## 2.2.2 Crescimento microbiano em condições não-isotérmicas

A temperatura de produtos alimentícios normalmente não é constante durante o armazenamento ao longo da sua vida útil. Os abusos de temperatura na cadeia de distribuição são comuns, especialmente

depois que o produto deixa o varejo, e tornam-se quase uma rotina no ambiente doméstico. A temperatura do ambiente doméstico varia muito, e o controle de temperatura em refrigeradores e congeladores domésticos é frequentemente pobre. Portanto, é muito importante compreender como as variações da temperatura de armazenamento influenciam as características dos alimentos (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000).

A temperatura, além de ser um dos fatores ambientais que mais varia durante a cadeia de produção e distribuição, é o fator ambiental que tem maior influência no crescimento microbiano. Desta forma, avaliar o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas torna-se essencial, pois as flutuações da temperatura podem comprometer a inocuidade dos alimentos. Os parâmetros do crescimento microbiano em alimentos são dependentes da temperatura, sendo que o aumento da temperatura (abaixo da temperatura ótima de crescimento) resulta em uma fase de adaptação menor e uma velocidade específica de crescimento maior, o que pode levar a deterioração mais rápida do alimento. Uma mudança brusca na temperatura, dependendo da intensidade, pode também induzir uma fase de adaptação intermediária do micro-organismo (SWINNEN et al., 2005). Um exemplo do crescimento microbiano em condições não-isotérmicas é apresentado na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Dados experimentais (símbolos), perfil de temperatura (linha tracejada) e predição de crescimento de *Listeria monocytogenes* em leite pasteurizado em condições não-isotérmicas (linha contínua).



Fonte: Xanthiakos et al. (2006).

## 2.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS

A modelagem matemática do crescimento microbiano em alimentos tornou-se uma importante área de pesquisa nas últimas décadas, em que os modelos propostos buscam descrever o crescimento microbiano para diferentes conjuntos de fatores intrínsecos e extrínsecos (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000). A modelagem do crescimento microbiano depende da integração de habilidades em diversos campos do conhecimento, como a microbiologia tradicional, a matemática, a estatística e os 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).

Os modelos matemáticos em microbiologia preditiva podem ser classificados de diversas maneiras. De acordo com McDonald e Sun (1999), os modelos podem ser classificados pelo nível de modelagem (modelos primários, secundários e terciários), pela sua concepção estrutural (modelos empíricos ou mecanísticos) e pelo interesse específico da modelagem (modelos cinéticos ou probabilísticos).

A definição dos modelos primários e secundários foi proposta por Whiting e Buchanan (1993). Os modelos primários são modelos usados para representar a curva de crescimento microbiano em função do tempo, para um único conjunto de condições ambientais constantes. Os modelos secundários são aqueles que descrevem a dependência dos parâmetros do modelo primário em relação a diferentes condições de cultivo, como em função da temperatura, pH ou atividade de água, por exemplo.

Há um grande número de modelos matemáticos para descrever o crescimento microbiano na literatura. Vadasz e Vadasz (2005) reportaram que 14 modelos estavam sendo usados de forma consistente na última década para modelagem em microbiologia preditiva. Entretanto, muitos modelos possuem parâmetros empíricos, que não possuem uma interpretação biológica, e muitas vezes apresentam uma capacidade preditiva menor. Alguns modelos matemáticos para descrição do crescimento microbiano em alimentos se destacam na literatura por suas características, sendo que o modelo de Baranyi e Roberts (1994) tem sido o mais usado. A descrição e os detalhes sobre este modelo serão abordados a seguir.

### 2.3.1 Modelo primário de Baranyi e Roberts

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) é amplamente utilizado em microbiologia preditiva. Em pesquisa à base de dados *Web of Knowledge* do *ISI – Institute for Scientific Information* em 17/12/2015 foram encontradas 1.018 citações do artigo que apresenta o modelo em sua forma mais usada (BARANYI; ROBERTS, 1994), 338 citações do artigo do modelo em sua concepção inicial (BARANYI; ROBERTS; McCLURE, 1993) e 206 citações do artigo que descreve a matemática do mecanismo envolvido no modelo (BARANYI; ROBERTS, 1995). Van Impe et al. (2005) sugeriram que o modelo de Baranyi e Roberts 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. A facilidade de uso do modelo pode ser relacionada com o desenvolvimento do *DMFit*, macro do *software Office Excel* que facilita o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts, distribuído de forma gratuita e incluso no site *ComBase* ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)) a partir de 2004 (BARANYI; TAMPLIN, 2004). O *DMFit* contribuiu de forma significativa para a popularização do uso deste modelo.

O crescimento microbiano pode ser avaliado em três diferentes fases (adaptação, exponencial e estacionária), conforme apresentado no item 2.2.1, sendo que cada uma dessas fases do crescimento microbiano pode ser descrita por diferentes funções matemáticas, conforme apresentado na Equação (2.2) (VAN IMPE et al., 2005).

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{lag}\mu_{max}\mu_{est}N(t) \quad (2.2)$$

A função  $\mu_{lag}$  tem por objetivo descrever o comportamento da fase de adaptação microbiana, ou seja, é uma função que descreve o ajuste do micro-organismo ao ambiente. No modelo de Baranyi e Roberts, a função de ajuste (originalmente descrita com o parâmetro  $\alpha$ ) descreve o mecanismo da evolução do estado fisiológico das células do micro-organismo ao novo ambiente através da Equação (2.3). O valor de  $\mu_{lag}$  varia de zero (micro-organismo não adaptado) a um (microrganismo totalmente adaptado).

$$\mu_{lag} = \alpha = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \quad (2.3)$$

Na Equação (2.3),  $q(t)$  é uma função que representa a evolução de uma substância crítica  $v$ , que pode ser relacionada com reações

enzimáticas envolvendo o micro-organismo. A equação diferencial (2.4) apresenta a relação da função  $q(t)$  com o parâmetro  $v$ , sendo que  $v$  pode ser considerado igual ao parâmetro  $\mu_{max}$ .

$$\frac{dq(t)}{dt} = vq(t) \quad (2.4)$$

A função  $\mu_{max}$  na Equação (2.2) é uma constante, que é o próprio parâmetro da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ). Os detalhes sobre este parâmetro já foram descritos anteriormente na seção 2.2.1, sendo que seu valor é sempre maior que zero (quanto maior o valor, maior é a velocidade de crescimento).

A função  $\mu_{est}$  na Equação (2.2), por sua vez, introduz o decréscimo gradual no crescimento microbiano (desaceleração), resultando na fase estacionária, sendo que a função  $\mu_{est}$  é conhecida como função de inibição. No modelo de Baranyi e Roberts, a função de inibição pertence à família de curvas de Richards (1959), Equação (2.5), sendo que não há mecanismo biológico na sua formulação.

$$\mu_{est} = 1 - \left( \frac{N(t)}{N_{max}} \right)^m \quad (2.5)$$

O parâmetro  $m$  é um fator de curvatura, e normalmente é considerado igual a um; ou seja, esse parâmetro pode ser desconsiderado do modelo; e o parâmetro  $N_{max}$  é o valor da população máxima atingida.

O modelo de Baranyi e Roberts, portanto, foi construído a partir da estrutura fundamental da Equação (2.2) e, em conjunto com as Equações (2.3) e (2.5) (e suas considerações), resultam na Equação (2.6).

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[ \frac{q(t)}{q(t) + 1} \right] \mu_{max} \left[ 1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right] N(t) \quad (2.6)$$

Para obter a curva de crescimento microbiano com suavização da fase exponencial é necessário fazer uma transformação logarítmica (logaritmo decimal ou natural) da concentração ( $y(t) = \log(N(t))$  ou  $y(t) = \ln N(t)$ ). A transformação é favorável porque homogeneiza os valores da função. Os valores da concentração microbiana que variam, aproximadamente, entre  $10^0$  e  $10^{10}$  Unidades Formadoras de Colônias por microlitro [UFC/mL], com a transformação pelo logaritmo natural passam a variar entre 0,0 e 23,0. A função  $q(t)$  também pode passar por transformação logarítmica ( $Q(t) = \ln q(t)$ ) e essas transformações resultam nas Equações (2.7) e (2.8).

$$\frac{dy(t)}{dt} = \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \mu_{max} [1 - \exp(y - y_{max})] \quad (2.7)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{max} \quad (2.8)$$

As condições iniciais para a resolução das Equações diferenciais (2.7) e (2.8) são  $y(0) = y_0$  e  $Q(0) = Q_0$ , sendo que  $y_0$  é o valor do logaritmo natural da concentração microbiana inicial, e  $Q_0$  é o valor do estado fisiológico inicial das células. As equações podem ser utilizadas para descrever o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas, sendo que os parâmetros do modelo se tornam função da temperatura.

As Equações diferenciais (2.7) e (2.8) podem ser resolvidas de forma algébrica, sendo que a solução explícita, que é apresentada nas Equações (2.9) e (2.10), é utilizada para a estimativa dos parâmetros do modelo para condições isotérmicas.

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} F(t) - \ln \left( 1 + \frac{\exp(\mu_{max} F(t)) - 1}{\exp(y_{max} - y_0)} \right) \quad (2.9)$$

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left( \frac{q_0 + \exp(-\mu_{max} t)}{1 + q_0} \right) \quad (2.10)$$

Para tornar o ajuste do modelo aos dados experimentais mais estável, Baranyi e Roberts (1994) aconselham a transformação do parâmetro  $q_0$  (chamado de estado fisiológico inicial das células) no parâmetro  $h_0$  (Equação (2.11)).

$$h_0 = \ln \left( 1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad (2.11)$$

Desta forma, a Equação (2.10) pode ser reescrita, conforme a Equação (2.12).

$$F(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln [\exp(-\mu_{max} t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{max} t - h_0)] \quad (2.12)$$

Por fim, a duração da fase de adaptação  $\lambda$  pode ser obtida pela Equação (2.13).

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{max}} \quad (2.13)$$

### 2.3.2 Modelo secundário da Raiz Quadrada

Os modelos secundários são utilizados para descrever a variação dos parâmetros de interesse do modelo primário em função de fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura (WHITING; BUCHANAN, 1993). Assim, de forma conceitual, qualquer equação que apresente uma boa descrição dos parâmetros do modelo primário com a temperatura pode ser usada como modelo secundário, como por exemplo, equações logarítmica e exponencial. Entretanto, por questões matemáticas de propriedades de ajuste, alguns modelos secundários são preferidos e têm sido utilizados com maior frequência na literatura de microbiologia preditiva.

O modelo secundário de Ratkowsky et al. (1982), conhecido como modelo da Raiz Quadrada (Equação (2.14)), é um dos modelos mais populares para descrever o efeito da temperatura sobre o parâmetro  $\mu_{max}$ . Os parâmetros  $T_{min}$  (temperatura teórica de mínimo crescimento microbiano) e  $b$  (parâmetro empírico) são os parâmetros ajustáveis do modelo, e  $T$  é a temperatura. Em pesquisa realizada na base de dados do ISI, em 17/12/2015, foram encontradas 597 citações do artigo que descreve o modelo. Este modelo tem a vantagem de homogeneizar a variância dos dados e fornecer uma resposta linear na região de temperaturas abaixo da temperatura ótima de crescimento (McMEEKIN et al., 2013).

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \quad (2.14)$$

Um aspecto importante a ser ressaltado é que o parâmetro  $T_{min}$  é um parâmetro associado à temperatura mínima de crescimento, sendo que o seu valor é obtido pelo ajuste do modelo matemático aos valores do parâmetro  $\mu_{max}$  em função da temperatura ( $T_{min}$  é valor onde o modelo intercepta o eixo da temperatura no ajuste). A temperatura mínima real em que o crescimento microbiano é observado, chamada de  $MIN_T$ , pode ser determinada através de experimentos, sendo que o valor estimado do parâmetro  $T_{min}$  geralmente é maior que a  $MIN_T$  (ROSS et al., 2011). Huang (2010) propôs a modificação do índice 2 da raiz do modelo pelo índice 1,5 e escreveu que o índice 1,5 resultou em um melhor ajuste do modelo aos valores de  $\mu_{max}$  para o crescimento de *Listeria monocytogenes* em carne. Entretanto, o valor de  $T_{min}$  apresentou uma superestimação ainda maior em relação a  $MIN_T$ , não sendo recomendado por outros autores (ROSS et al., 2011).

O modelo da Raiz Quadrada pode ser utilizado apenas para descrever os dados de  $\mu_{max}$  abaixo da temperatura ótima de crescimento do micro-organismo ( $\mu_{opt}$ ). Se o interesse do estudo é avaliar toda a faixa em que há crescimento microbiano (desde a temperatura mínima até a temperatura máxima em que há crescimento), o modelo ampliado de Ratkowsky et al. (1983) ou o modelo de temperaturas cardinais de Rosso et al. (1993) podem ser indicados.

### 2.3.3 Análises estatísticas

A capacidade dos modelos matemáticos de descrever os dados experimentais pode ser avaliada através da raiz do erro quadrático médio entre os dados observados ( $y_{obs}$ ) e os dados preditos ( $y_{pdt}$ ) pelo modelo ( $RMSE$ , Equação (2.15)), e através do coeficiente de determinação ( $R^2$ , Equação (2.16)). Nas Equações (2.15) e (2.16),  $num$  é o número de dados observados,  $SSE$  (Equação (2.17)) é o somatório da diferença quadrática entre  $y_{obs}$  e  $y_{pdt}$ , e  $SST$  (Equação (2.18)) é o somatório da diferença quadrática entre  $y_{pdt}$  e a média dos dados observados ( $\overline{y_{obs}}$ ). Se considerar o ajuste do mesmo modelo matemático para diferentes conjuntos de dados experimentais, os melhores ajustes são obtidos quando valores de  $R^2$  são próximos de um e valores de  $RMSE$  são próximos de zero.

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSE}{num}} \quad (2.15)$$

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (2.16)$$

$$SSE = \sum_{i=1}^{num} (y_{obs(i)} - y_{pdt(i)})^2 \quad (2.17)$$

$$SST = \sum_{i=1}^{num} (y_{pdt(i)} - \overline{y_{obs}})^2 \quad (2.18)$$

Os intervalos de confiança ( $IC$ ) dos parâmetros estimados são dados pela Equação (2.19), sendo que  $par$  é o vetor dos valores dos parâmetros obtidos no ajuste,  $m$  é um escalar que depende do nível de confiança e é calculado usando o inverso da função da distribuição cumulativa  $t$  de Student, e  $S$  é o vetor dos elementos da diagonal da matriz de covariância estimada dos parâmetros ajustados,  $(X^T X)^{-1} s^2$ . Para um ajuste não-linear,  $X$  é a Jacobiana dos valores ajustados em relação aos

parâmetros;  $X^T$  é a transposta de  $X$ , e  $s^2$  é o erro quadrático médio (WALTER; PRONZATO, 1997).

$$IC = par \pm tn\sqrt{S} \quad (2.19)$$

Os intervalos de predição ( $IP$ ) simultâneos da função com o uso dos parâmetros estimados e de todos os valores preditos são dados pela Equação (2.20), sendo que  $x$  é a Jacobiana avaliada nos valores preditos especificados (WALTER; PRONZATO, 1997).

$$IP = y_{pdt} \pm tn\sqrt{xSx^T} \quad (2.20)$$

A capacidade preditiva dos modelos matemáticos tem sido tradicionalmente avaliada pelo *fator tendência* (*bias factor*), Equação (2.21), que indica se o modelo matemático tem a tendência de superestimar o crescimento (falha segura, *fator tendência*  $> 1$ ) ou de subestimar o crescimento (falha perigosa, *fator tendência*  $< 1$ ); e também pelo *fator exatidão* (*accuracy factor*), Equação (2.22), que avalia a exatidão da predição, sendo que quanto mais próximo de um mais exata é a predição (ROSS, 1996).

$$fator\ tendência = 10^{\frac{\sum_{i=1}^{num} \left[ \log \left( \frac{y_{pdt(i)}}{y_{obs(i)}} \right) \right]}{num}} \quad (2.21)$$

$$fator\ exatidão = 10^{\frac{\sum_{i=1}^{num} \left[ \log \left| \frac{y_{pdt(i)}}{y_{obs(i)}} \right| \right]}{num}} \quad (2.22)$$

A análise de Monte Carlo é uma ferramenta que pode ser utilizada para analisar a incerteza da resposta e a sensibilidade dos valores dos parâmetros de um modelo matemático através da incorporação de variação nos dados experimentais com um gerador de números pseudoaleatórios. Esse gerador gera pseudo-respostas considerando uma certa distribuição de probabilidade (em microbiologia utiliza-se a distribuição normal quando os dados são expressos em logaritmo natural da concentração por unidade), e os parâmetros do modelo são estimados para esse novo conjunto de respostas. Esse procedimento é repetido enésimas vezes, resultando em enésimos valores dos parâmetros; esses valores são compilados e apresentados na forma de distribuição de frequência, em que é possível calcular a média, desvio padrão, entre outras informações estatísticas importantes para a análise da qualidade das respostas do modelo (POSCHET et al., 2003).

### 2.3.4 Algoritmos para a estimativa dos parâmetros de modelos não-lineares

A programação não-linear, comumente apresentada na literatura com a sigla NLP (*NonLinear Programming*), é o processo de resolução de um problema de otimização definido por um sistema de igualdades e desigualdades, denominadas restrições, sobre um conjunto de variáveis reais desconhecidas e associadas com uma função objetivo a ser maximizada ou minimizada, sendo que algumas das restrições ou a função objetivo é não-linear (BERTSEKAS, 1999). A NLP tem sido extensivamente abordada na literatura nas áreas de métodos numéricos, pesquisa operacional, engenharia de sistemas, entre outras. Neste contexto, uma grande quantidade de estudos tem proposto algoritmos para a solução de NLP, como por exemplo, Aproximação Linear, Programação Quadrática Sequencial, Gradientes Reduzidos Generalizados, algoritmo Genético, entre muitos outros, incluindo diversas propostas de algoritmos híbridos (MELO, 2012). As discussões sobre a eficiência e as aplicações dos diferentes algoritmos envolvem uma alta complexidade matemática, sendo objeto de estudos dedicados especialmente para este fim.

Os problemas não-lineares nesta tese de doutorado são abordados e solucionados com algoritmos disponíveis em *software* ou *toolbox*, tendo em vista a praticidade e facilidade de utilização e aplicação posterior pelos interessados em microbiologia preditiva que não são familiarizados com a NLP. Assim, será apresentada a seguir a descrição sucinta dos algoritmos utilizados nesta tese: Gradientes Reduzidos Generalizados – GRG (disponível na ferramenta *Solver* do *software Office Excel* (Microsoft, Redmond, WA, USA)) e Busca Dispersa – BD (disponível no *toolbox* AMIGO (IIM-CSIS, Vigo, Espanha) para programação em Matlab (Mathworks, Natick, USA)).

O algoritmo GRG trata da solução de problemas de otimização não-lineares nos quais a função objetivo pode ter não linearidades de qualquer forma, contando que essa função seja diferenciável (DANTAS et al., 2007). O método GRG foi uma generalização do método dos Gradientes Reduzidos proposta por Abadie e Carpentier (1969), sendo que essa generalização permitiu que o método fosse introduzido para as restrições não-lineares. A programação computacional para o algoritmo GRG foi proposto por Lasdon et al. (1978). De acordo com os autores, o problema é resolvido minimizando uma sequência de problemas reduzidos nos quais a função objetivo reduzida possui um vetor de variáveis não básicas, sendo que o sistema itera utilizando uma pesquisa

unidimensional por meio de uma variação do método de Newton. GRG é o algoritmo padrão para solução de NLP no *software Office Excel*.

BD é um método evolutivo que combina soluções com a finalidade de criar novas soluções com alta qualidade para dirigir a busca a regiões promissoras (SOSA; GALVÃO; GANDELMAN, 2007). O método BD foi proposto por Glover (1977) como heurística para programação inteira, sendo que orienta a exploração sistematicamente, relativa ao conjunto de pontos de referência na solução do problema, que tipicamente consistem de boas soluções obtidas por esforços prévios. O método BD é muito flexível, pois cada um dos seus elementos pode ser implementado em uma variedade de formas e graus de sofisticação (EGEA et al., 2007). BD é o algoritmo padrão (chamado de SSm – *Scatter Search matlab*) para solução de NLP no *toolbox* AMIGO para programação em Matlab.

## 2.4 ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DOS MODELOS MATEMÁTICOS PARA O CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS

A estimativa de parâmetros do crescimento microbiano pode ser realizada por diferentes abordagens que têm sido propostas na literatura, como (i) a abordagem tradicional de modelagem em duas etapas (MDE), (ii) a abordagem de modelagem em uma etapa (MUE), e (iii) o delineamento experimental ótimo para a estimativa de parâmetros (DEO). As diferentes abordagens foram propostas em períodos distintos na literatura da área, sendo que a abordagem tradicional de duas etapas é a mais antiga e continua sendo a mais utilizada pelos pesquisadores. A descrição detalhada de cada abordagem será apresentada a seguir.

### 2.4.1 Modelagem em Duas Etapas (MDE)

Os experimentos em microbiologia preditiva são tradicionalmente planejados através de delineamentos fatoriais, sendo que diversos experimentos são conduzidos em diferentes valores constantes (níveis) para os fatores que influenciam a cinética microbiana. A partir dos dados coletados nestes diversos experimentos são utilizados os modelos primários e secundários, separadamente, em duas etapas. Na primeira etapa, o modelo primário é ajustado aos dados do crescimento microbiano para várias condições constantes (por exemplo, isotérmicas) para obtenção dos parâmetros de crescimento em cada condição avaliada. Na segunda etapa, os modelos secundários são ajustados aos dados dos

parâmetros do modelo primário, obtendo-se os parâmetros do modelo secundário (os quais descrevem a dependência dos parâmetros do modelo primário, como por exemplo, em função da temperatura).

A MDE é uma abordagem muito intuitiva e relativamente simples de usar para obter a estimativa de parâmetros dos modelos matemáticos. Por esse motivo, a grande maioria das pesquisas tem utilizado a MDE, em que são analisados os níveis constantes dos principais fatores extrínsecos e intrínsecos de interesse para o estudo (sendo os principais a temperatura, o pH e a atividade de água). Entretanto, a estimativa dos parâmetros dos modelos através da MDE requer uma grande quantidade de dados experimentais, tanto os dados necessários em cada condição constante quanto pelas diferentes condições que precisam ser testadas, tornando este método de estimativa de parâmetros demorado, extensivo e com custos elevados. Outra desvantagem está relacionada com a dificuldade de conduzir experimentos em condições constantes, como por exemplo, os experimentos isotérmicos, pois pequenas flutuações de temperatura normalmente ocorrem no experimento, e é praticamente impossível manter o experimento sob a mesma temperatura, principalmente para alimentos de maiores volumes e sem agitação adequada (e isso conduz a pequenos erros experimentais) (CHEN; CAMPANELLA, 2012). Além disso, os parâmetros estimados dos modelos secundários são obtidos de estimativas anteriores (parâmetros do modelo primário), as quais já estão caracterizadas por um erro de estimativa. Embora essas estimativas possam descrever com precisão o crescimento microbiano em um ambiente constante, desvios dos dados experimentais podem ser observados quando o modelo é testado para condições ambientais variáveis (VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008).

A MDE apresenta também limitações matemáticas para a estimativa dos parâmetros, pois a utilização de condições constantes não fornece informação sobre a dinâmica do fenômeno, o que pode impossibilitar que se encontre um único valor para os parâmetros dos modelos. Além disso, a seleção de uma solução particular pode levar a conclusões erradas sobre as capacidades de previsão do modelo (BALSA-CANTO; ALONSO; BANGA, 2008).

## **2.4.2 Modelagem em Uma Etapa (MUE)**

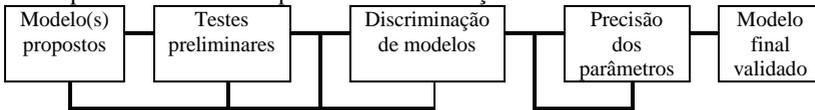
Como o próprio nome diz, na MUE a estimativa dos parâmetros dos modelos primário e secundários é realizada simultaneamente em uma etapa com os dados do crescimento microbiano em condições constantes ou variáveis. A quantidade de experimentos necessários para realizar a estimativa de parâmetros na MUE normalmente é menor que na MDE, e depende da quantidade de parâmetros a serem estimados, sendo recomendado que se realize, pelo menos, um experimento a mais do que o número de parâmetros do modelo secundário (CHEN; CAMPANELLA, 2012).

A estimativa de parâmetros através da MUE apresenta várias vantagens em relação à MDE. As reduções do tempo e dos custos experimentais para obtenção dos resultados são as vantagens mais atrativas. Outra importante vantagem é que no experimento dinâmico o micro-organismo é excitado e forçado a revelar a influência desta dinâmica nos parâmetros do modelo, e assim fornece maior informação sobre as suas estimativas (VERSYCK et al., 1999). Uma desvantagem da MUE é que não há um critério para definir quais são os tipos de experimentos que podem levar aos parâmetros do modelo matemático com maior qualidade de informação, sendo que nesse aspecto há uma infinidade de possibilidades.

## **2.4.3 Delineamento Experimental Ótimo (DEO)**

O DEO consiste na determinação de um esquema dinâmico ótimo de medições experimentais que aumenta a qualidade das informações obtidas em um experimento, sendo que o objetivo final é a estimativa de parâmetros de modelos matemáticos com maior precisão e decorrelação (BALSA-CANTO; ALONSO; BANGA, 2008; VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008). As principais vantagens do DEO em comparação com as outras abordagens é a redução significativa da quantidade de experimentos, pois o delineamento ótimo contribui para simplificar o planejamento experimental, e a execução dos experimentos delineados resulta em dados mais informativos para uso na estimativa de parâmetros e validação dos modelos matemáticos (FRANCESCHINI; MACCHIETTO, 2008). As etapas básicas que devem ser seguidas durante a construção e a utilização do modelo matemático no DEO são apresentadas na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Procedimento baseado em técnicas de delineamento experimental ótimo para a estimativa de parâmetros e validação de modelos matemáticos.



Fonte: adaptado de Franceschini e Macchietto (2008).

No início do processo, um ou mais modelos matemáticos devem ser propostos como candidatos para descrever o sistema em estudo (*Propose model/s*). Os testes preliminares (*preliminary tests*) devem investigar se é possível obter informações sobre os modelos a partir dos dados experimentais; se não, modelos ou experimentos alternativos devem ser selecionados. Testes de identificabilidade estrutural (teórica) e aplicada (prática) do(s) modelo(s) devem ser realizados para verificar se os parâmetros do modelo podem ter significado físico, e é desejável saber se é possível determinar os seus valores, se experimentos desnecessários podem ser evitados, e se as ferramentas matemáticas podem ajudar na seleção apropriada das variáveis de medição experimental para fins de identificação do modelo e parâmetros. O teste de identificabilidade aplicada é complementar ao teste de identificabilidade estrutural, sendo que o interesse é verificar o impacto dos dados experimentais disponíveis sobre os parâmetros do modelo estudado. Um exemplo típico de distinção entre os dois conceitos de identificabilidade é o estudo do modelo de Monod (1949) usado na cinética de crescimento microbiano em biorreator com um substrato limitante e uma biomassa. É possível mostrar que o modelo é identificável na sua estrutura, mas acaba não sendo identificável na prática se os dados experimentais são limitados e de baixa qualidade (VANROLLEGHEM; DOCHAIN, 1998).

Na etapa de discriminação de modelos (*model discrimination*), experimentos ótimos devem ser delineados e executados a fim de discriminar os modelos concorrentes que passaram nos testes preliminares. Em seguida se realiza a estimativa de parâmetros e checagem da adequação dos modelos para determinar se é possível rejeitar algum dos modelos propostos, com o propósito final de selecionar o modelo mais adequado a partir de uma determinada condição. Os modelos inadequados são rejeitados e, então, o(s) modelo(s) mais adequado(s) pode(m) ser submetido(s) a outros delineamentos experimentais ótimos a fim de melhorar a precisão dos seus parâmetros (*parameter precision*). A formulação final do modelo é estatisticamente verificada e são obtidos os valores mais precisos para seus parâmetros

(*final validated model*). Se resultados insatisfatórios são obtidos em cada uma das etapas, então as etapas devem ser repetidas até que um modelo validado seja alcançado (ASPREY; MACCHIETTO, 2002; FRANCESCHINI; MACCHIETTO, 2008).

Os experimentos ótimos são obtidos a partir da otimização de um determinado critério baseado na Matriz de Informação de Fisher (*MIF*) apresentada na Equação (2.23), sendo que  $p$  é o vetor de parâmetros,  $y$  é a resposta do modelo matemático,  $\partial y / \partial p$  é a matriz de sensibilidades da resposta do modelo em relação a pequenas variações nos parâmetros, que depende da escolha das condições experimentais dinâmicas, e  $W$  é uma matriz de ponderação, que normalmente considera o ruído experimental (BERNAERTS; VERSYCK; VAN IMPE, 2000; MUNACK, 1989; VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008). Assim, a matriz  $W$  pode ser formada pelo valor da inversa de variância do ruído experimental ( $1/\sigma^2$ ), sendo que é assumido que os dados são perturbados de acordo com o ruído branco gaussiano (BERNAERTS; VERSYCK; VAN IMPE, 2000).

$$MIF = \int_0^{t_f} \left( \frac{\partial y}{\partial p} \right)^T W \left( \frac{\partial y}{\partial p} \right) dt \quad (2.23)$$

O delineamento baseado na *MIF* permite maior flexibilidade experimental, sendo que é possível definir como graus de liberdade as condições iniciais, os tempos de amostragem, a duração dos experimentos, as variáveis manipuláveis dependentes do tempo, e a quantidade de experimentos (BALSA-CANTO; ALONSO; BANGA, 2008). A matriz inversa da *MIF* aproxima o limite inferior da matriz de variância-covariância de estimativa dos parâmetros dos modelos matemáticos (VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008).

Os principais critérios de otimização da *MIF* que têm sido utilizados são A-, D-, E- e E- modificado (ASPREY; MACCHIETTO, 2002; BALSA-CANTO; ALONSO; BANGA, 2008; VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008), sendo que os critérios G-, L-, C- e Ds, por exemplo, são menos utilizados (FRANCESCHINI; MACCHIETTO, 2008). O critério A- tende a maximizar o traço (soma dos elementos da diagonal principal) da *MIF*, ou minimizar o traço da matriz de variância-covariância. Este critério é considerado muito instável, em especial quando há alta correlação entre os parâmetros, pois os elementos que estão fora da diagonal da matriz não são inclusos na função objetivo e isso provoca uma perda apreciável de informações no caso de elevada correlação entre os parâmetros. O critério D- tende a

maximizar o determinante da *MIF*, ou minimizar o determinante da matriz de variância-covariância, o que resulta no menor volume da região de confiança dos parâmetros. Esse critério apresenta um indicativo da qualidade das informações dos experimentos: quanto maior é o valor resultante, menor é a região de confiança para as estimativas de parâmetros. O critério E- tende a maximizar o menor autovalor da *MIF*, ou minimizar o maior autovalor da matriz de variância-covariância. Esse procedimento conduz a uma decorrelação máxima dos parâmetros estimados, porém negligencia a incerteza dos parâmetros restantes. O critério E- modificado minimiza a relação entre o maior e o menor autovalor da *MIF*, e assim faz com que a região de confiança seja a mais esférica possível. Este critério é bastante atraente, pois a solução ótima global é conhecida (igual a um), significando que os parâmetros são completamente não correlacionados, e por isso esse critério tem sido utilizado com frequência (BALSA-CANTO; RODRIGUEZ-FERNANDEZ; BANGA, 2007; VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008; FRANCESCHINI; MACCHIETTO, 2008; GRIJSPEERDT; DE REU, 2005; VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008). A interpretação geométrica dos critérios A-, D- e E- é apresentada na Figura 2.4.

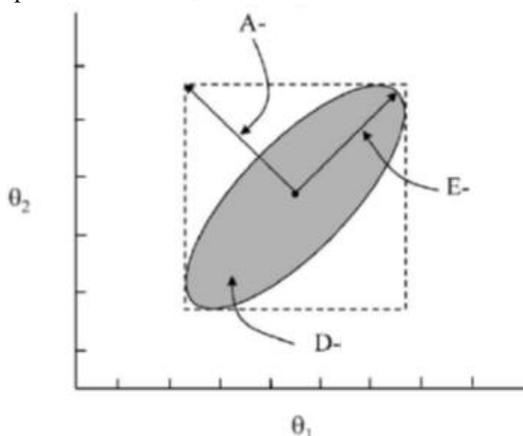
A estimativa dos parâmetros pode ser formulada pela minimização de uma função objetivo  $J$ , de acordo com a Equação (2.24), sendo que  $y_{obs}(t)$  é o vetor de dados experimentais em função do tempo;  $y_{pat}(par, t)$  é o vetor das predições pelo modelo, o qual é função do vetor de parâmetros e do tempo; e  $t_{end}$  é o tempo experimental final. Se  $W$  é constante, então a função objetivo computa o erro quadrático acumulado entre os dados experimentais e as predições do modelo (MUNACK, 1989; VERSYCK et al., 1999; NAHOR et al., 2001).

$$J = \int_0^{t_{end}} [y_{pat}(par, t) - y_{obs}(t)]^T W [y_{pat}(par, t) - y_{obs}(t)] dt \quad (2.24)$$

Para modelos não-lineares, as sensibilidades das respostas do modelo e, portanto, a *MIF* depende do vetor de parâmetros ( $par$ ). No DEO,  $J$  é computado partindo de uma estimativa inicial para os parâmetros desconhecidos do modelo, isto é, os chamados parâmetros iniciais ou nominais ( $par^o$ ). Os valores para estes parâmetros nominais podem ser obtidos a partir da literatura ou experimentos preliminares. Em um delineamento iterativo,  $par^o$  é substituído a cada iteração pelas novas estimativas dos parâmetros até que a convergência seja alcançada e,

então, o modelo é validado. A *MIF* também determina a forma da função objetivo  $J$  próximo do seu mínimo (VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008). Os fatores que podem influenciar a eficiência do DEO são (i) a escolha do algoritmo de minimização dos resíduos entre o modelo e os dados experimentais; (ii) a escolha dos parâmetros nominais do modelo; (iii) a determinação dos graus de liberdade do sistema (variações do perfil da variável dinâmica), e (iv) os critérios de otimização baseados na *MIF*. Ao final do procedimento de estimativa são obtidos os valores dos parâmetros ( $par$ ) que minimizam a função objetivo  $J$ , sendo que se espera que estes parâmetros não sejam muito diferentes dos valores nominais ( $par^o$ ).

Figura 2.4 – Interpretação geométrica dos critérios de otimização A-, D- e E- na estimativa dos parâmetros  $\theta_1$  e  $\theta_2$ .



Fonte: adaptado de Asprey e Macchietto (2002).

## 2.5 O ESTADO DA ARTE DAS ABORDAGENS NA LITERATURA

### 2.5.1 Modelagem em Duas Etapas (MDE)

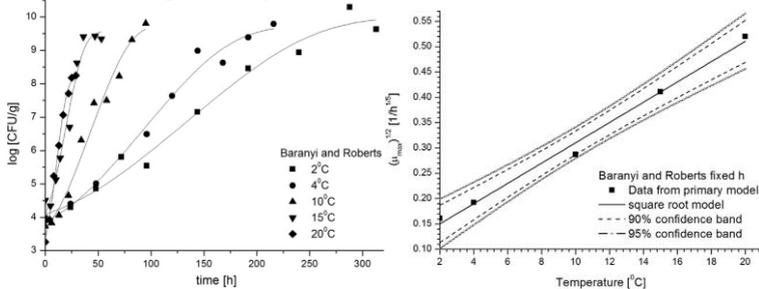
A MDE é considerada uma abordagem tradicional porque tem sido muito utilizada desde o impulso da microbiologia preditiva na década de 1980, sendo que um indicativo é a grande quantidade de trabalhos na literatura que tem sido publicado utilizando a MDE. De forma geral, uma grande quantidade de modelos matemáticos com seus parâmetros

estimados através da MUE tem sido validada para diferentes micro-organismos e em diferentes tipos de meios de cultivo e alimentos (BARANYI et al., 1995; KOUTSOUMANIS, 2001; XANTHIAKOS et al., 2006; JUNEJA et al., 2007; GOSPAVIC et al., 2008; entre outros).

O grupo de pesquisa em microbiologia preditiva da Universidade Federal de Santa Catarina, um dos grupos de pesquisa mais atuantes da área no Brasil, tem publicado diversos trabalhos utilizando a MDE. Dentre os mais recentes é possível citar, por exemplo, Longhi et al. (2013), Zimmermann et al. (2014), Longhi et al. (2014), Tremarin et al. (2015), Camargo (2015), Silva (2015) e Martins (2015). Os principais estudos do grupo foram direcionados à estimativa de parâmetros de crescimento de bactérias deteriorantes de alimentos.

Um exemplo geral de MDE utilizado para a estimativa dos parâmetros de crescimento de *Pseudomonas spp.* em carne de frango (GOSPAVIC et al., 2008) é apresentado na Figura 2.5. Na primeira etapa, o modelo primário de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados de cinco experimentos em diferentes temperaturas (2, 4, 10, 15 e 20 °C), e na segunda etapa, o modelo da raiz quadrada foi ajustado aos valores do parâmetro  $\mu_{max}$  obtidos na primeira etapa.

Figura 2.5 – MDE utilizado na estimativa dos parâmetros de crescimento de *Pseudomonas spp.* em carne de frango. À esquerda: ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts (primeira etapa); à direita: ajuste do modelo secundário da Raiz Quadrada (segunda etapa).



Fonte: adaptado de Gospavic et al. (2008).

## 2.5.2 Modelagem em Uma Etapa (MUE)

A MUE tem sido muito menos utilizada que a MDE em microbiologia preditiva. Os trabalhos que utilizaram a MUE são mais recentes, sendo que é possível destacar os trabalhos de Gil, Brandão e

Silva (2006), Smith-Simpson et al. (2007), Chen e Campanella (2012), e Dolan, Valdramidis e Mishra (2013) como exemplos.

Gil, Brandão e Silva (2006) realizaram a estimativa de cinco parâmetros de modelos matemáticos com dados pseudo-experimentais de apenas um experimento de inativação de *L. monocytogenes* em condições não-isotérmicas. Portanto, os resultados da simulação podem ser considerados apenas como ilustrativos da MUE. Smith-Simpson et al. (2007) também apresentaram um trabalho de simulação de estimativa de quatro parâmetros de crescimento de *Clostridium perfringens* em carne moída resfriada com dados pseudo-experimentais gerados para duas diferentes condições não-isotérmicas (aquecimento e resfriamento). Os autores simularam cinco conjuntos de dados pseudo-experimentais para cada caso (aquecimento e resfriamento), e além disso, dois diferentes níveis de ruído experimental, e então ajustaram os modelos aos dados pseudo-experimentais obtidos, resultando em uma ilustração da MUE.

Chen e Campanella (2012) propuseram um algoritmo para a MUE. Um estudo de caso foi apresentado para a inativação de *Salmonella enteritidis*, *L. monocytogenes* e *Clostridium botulinum* durante o processamento térmico, sendo estimados três parâmetros de inativação de cada micro-organismo. Os autores utilizaram quatro experimentos para a estimativa dos três parâmetros, sendo intercalados três experimentos para estimativa dos parâmetros e um experimento para validação em um procedimento iterativo.

Dolan, Valdramidis e Mishra (2013) realizaram a estimativa de parâmetros da inativação de *E. coli* K12 em condições não-isotérmicas com a MUE. Os resultados mostraram que os parâmetros do modelo matemático podem ser afetados pelo formato do perfil de temperatura empregado na inativação térmica. Os valores estimados para os parâmetros a partir do ajuste do modelo a todos os dados experimentais simultaneamente foram diferentes dos valores dos mesmos parâmetros quando estimados separadamente. De acordo com os autores, a grande diferença entre as estimativas indica que os parâmetros são, de fato, diferentes para diferentes taxas de aquecimento, sendo que essa incerteza encontrada para os valores dos parâmetros é uma das justificativas da pouca adesão da MUE pelos pesquisadores.

### 2.5.3 Delineamento Experimental Ótimo (DEO)

A origem do trabalho matemático para o delineamento de experimentos teve início com Smith (1918) que obteve delineamentos

ótimos para uma série de modelos polinomiais de fator simples. Os conceitos fundamentais do delineamento experimental ótimo surgiram em meados da década de 1930 com o trabalho de Fisher (1935), que descreveu o problema básico do delineamento experimental, como as decisões sobre os padrões das combinações de fatores que revelam melhor as propriedades da resposta e como essa resposta é influenciada pelos fatores (ATKINSON, 1996; FRANCESCHINI; MACCHIETTO, 2008). O desenvolvimento do delineamento experimental seguiu com contribuições de diversos autores ao longo das décadas seguintes, como os trabalhos de Kiefer (1959), e Box, Hunter e Hunter (1978). No passado recente, o DEO tem sido muito utilizado em áreas como a química, a bioquímica e a engenharia ambiental, aplicado nas áreas de processos biológicos, redes bioquímicas, cinética química e transferência de calor e massa (FRANCESCHINI; MACCHIETTO, 2008; GRIJSPEERDT; DE REU, 2005), sendo que tem sido extensivamente estudado no campo da engenharia de biorreatores a partir da década de 1980 (VERSYCK et al., 1999).

Os trabalhos científicos do DEO na área da microbiologia preditiva têm sido publicados por poucos grupos de pesquisa, sendo que os que se destacam são o Laboratório de Tecnologia e Controle em Bioprocessos (*BioTeC*) da Universidade Católica de Leuven – Bélgica, e o Grupo de Engenharia de Processos do Instituto de Investigações Marinhas (*IIM-CSIC*) de Vigo – Espanha. Os primeiros trabalhos publicados utilizando o DEO em microbiologia preditiva tinham o objetivo de melhorar as propriedades de estimativa de parâmetros e otimizar o trabalho experimental para modelos de crescimento e inativação (VERSYCK et al., 1999; BERNAERTS; VERSYCK; VAN IMPE, 2000; BERNAERTS et al., 2002). Versyck et al. (1999) apresentaram uma introdução do DEO em microbiologia preditiva, em que descreveram detalhadamente todas as etapas para validação de modelos matemáticos com o DEO. Adicionalmente, os autores apresentaram um estudo de caso voltado ao delineamento ótimo de experimentos de inativação de *Lactobacillus* sp. para cinco diferentes perfis de temperatura. Os autores puderam concluir que os perfis de temperatura em platôs fornecem mais informações sobre o sistema do que perfis de temperatura lineares ou quadráticos, as curvas de nível da função objetivo apresentaram formato elipsoidal (aproximadamente circular) e intervalos de confiança dos parâmetros satisfatórios. Para o perfil de temperatura constante, os autores demonstram através das análises de identificabilidade estrutural e prática que não é possível obter soluções únicas para os parâmetros.

Grijspeerdt e Vanrolleghem (1999) realizaram testes de identificabilidade estrutural e prática do modelo de Baranyi e Roberts (1994). Os autores demonstraram usando a abordagem da série de Taylor que é possível obter soluções únicas para todos os parâmetros do modelo quando dados experimentais de qualidade e em número suficiente são usados no DEO.

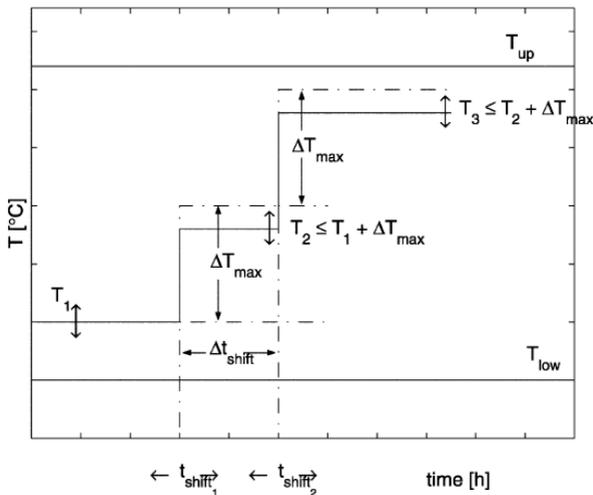
Bernaerts, Versyck e Van Impe (2000) utilizaram o DEO para estimar os parâmetros do modelo secundário da Raiz Quadrada, que foi usado para descrever o efeito de temperaturas sub-ótimas na velocidade específica máxima de crescimento de *E. coli* MG1655. Com relação aos diferentes perfis de temperatura, os resultados do trabalho foram semelhantes aos resultados de Versyck et al. (1999) e, por isso, os autores delineararam um perfil otimizado em platôs. Um perfil ótimo obtido foi a mudança de platô de 12 °C para 37 °C no tempo de 26,8 horas, com duração total do experimento de 38,5 horas. Um experimento foi realizado com mudança de platô no tempo de 26,5 horas e com duração total do experimento de 35 horas para a estimativa dos parâmetros. Os parâmetros nominais utilizados foram  $b = 0,0475 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}\text{h}^{-0,5}$  e  $T_{min} = 6,53 \text{ } ^\circ\text{C}$ , e os parâmetros estimados foram  $b = 0,0400 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}\text{h}^{-0,5}$  e  $T_{min} = 5,94 \text{ } ^\circ\text{C}$ , sendo que o procedimento iterativo para melhorar a estimativa dos parâmetros não foi realizado.

Bernaerts et al. (2002) colaboraram com aspectos importantes para o DEO em microbiologia preditiva. Os autores indicaram algumas restrições e definições de graus de liberdade importantes no delineamento de experimentos (Figura 2.6), como a limitação da amplitude na mudança de temperatura ( $\Delta T_{max}$ , para evitar as fases de adaptação intermediárias, as quais não são levadas em consideração nos modelos) e o tempo mínimo de permanência em cada temperatura ( $\Delta t_{shift}$ , para que haja ao menos uma duplicação da população). Os platôs de temperaturas ( $T_1, T_2, \dots, T_n$ ), os tempos para mudança entre temperaturas ( $t_{shift1}, t_{shift2}, \dots, t_{shiftn}$ ) e o tempo final do experimento são indicados como graus de liberdade para o delineamento.

Um estudo aplicado do DEO em microbiologia de alimentos foi apresentado por Grijspeerdt e De Reu (2005), que determinaram perfis de temperatura ótimos para a estimativa de parâmetros dos modelos de Baranyi e Roberts e da Raiz Quadrada para o crescimento de *Bacillus cereus* e *Enterobacter cloacae* isolados de ovo líquido comercial. Os autores impuseram a limitação da amplitude na mudança de temperatura em 5 °C. Nos resultados, os autores destacaram um problema de ajuste do modelo aos dados experimentais de *B. cereus* nas transições entre as fases

(adaptação, exponencial e estacionária), bem como na mudança de platôs de temperatura. Este problema de ajuste ocasionou a estimativa de parâmetros com menor qualidade do ponto de vista estatístico, ou seja, desvio padrão e intervalos de confiança maiores. Os autores concluíram que dois ou mais platôs de temperatura são benéficos para melhorar a decorrelação entre os parâmetros do modelo (corroborando as conclusões de Bernaerts et al. (2002)), porém tornam o planejamento dos experimentos mais difícil, e enfatizaram que é aconselhável amostrar maior quantidade de dados experimentais em torno dos tempos ótimos de coleta preditos no delineamento. Além disso, devido à incerteza do delineamento, é aconselhável também amostrar em tempos diferentes dos otimizados para minimizar o risco de não detectar uma fase crucial do crescimento microbiano.

Figura 2.6 – Restrições e graus de liberdade para o delineamento ótimo de experimentos.



Fonte: Bernaerts et al. (2002).

Um dos estudos mais recentes de DEO em microbiologia preditiva (VAN DERLINDEN; MERTENS; VAN IMPE, 2013) é a avaliação do impacto do delineamento experimental sobre a estimativa de parâmetros do modelo de parâmetros cardinais de Rosso et al. (1993), o qual descreve o efeito da atividade de água, pH e temperatura no crescimento de *E. coli* K12 MG1655. O delineamento ótimo com o critério D- produziu parâmetros mais realistas em relação a outros delineamentos.

Com relação aos critérios de otimização da *MIF* no DEO, Munack e Posten (1989) recomendam que o critério A- não deve ser empregado, pois pode levar a experimentos não informativos. O critério D- é um dos critérios mais utilizados devido a algumas propriedades atraentes: fácil interpretação geométrica, invariância teórica em relação a qualquer transformação não degenerada aplicada sobre os parâmetros do modelo (tal como redimensionamento), e produção de delineamentos ótimos que correspondem à repetição de um pequeno número de diferentes condições experimentais; entretanto, o critério D- tende a dar importância excessiva para o parâmetro em que o modelo é mais sensível. Assim, embora o volume de região de confiança possa ser reduzido graças a uma diminuição da variação deste parâmetro do modelo, as incertezas de todos os outros parâmetros podem permanecer muito grandes (FRANCESCHINI; MACCHIETTO, 2008). O critério E- modificado também tem desvantagens: a razão entre os autovalores indica que o critério é descontínuo, o qual pode causar problemas de convergência quando for usado com uma rotina de otimização baseada em gradiente. Outra limitação é que elipsoides circulares com volumes muito grandes podem ser obtidos, e assim a incerteza dos parâmetros é grande. Além disso, este critério só pode ser usado para modelos de dois parâmetros (VAN DERLINDEN; BERNAERTS; VAN IMPE, 2008). Balsa-Canto, Alonso e Banga (2008) verificaram que o critério E-modificado não é sensível ao número de pontos amostrados, ou seja, a mesma solução é encontrada com diferentes amostragens, mas o tamanho e a forma dos elipsoides de confiança dos parâmetros não são iguais. Por sua vez, os critérios D- e E- foram afetados pela quantidade e localização dos pontos de amostragem.

Para usuários não familiarizados com a matemática complexa do DEO, Balsa-Canto e Banga (2011) disponibilizaram de forma gratuita um *toolbox* para Matlab denominado AMIGO (*Advanced Model Identification using Global Optimization*). AMIGO é o primeiro aplicativo multiplataforma (Windows e Linux) que abrange todas as etapas do procedimento iterativo de identificação do DEO, sendo que seu objetivo é permitir o cálculo de incógnitas de modelos com maior precisão e menor carga experimental. Dentre as tarefas disponíveis no *toolbox* é possível destacar as análises de sensibilidade e classificação de parâmetros, a simulação do modelo matemático, a análise de identificabilidade prática, o delineamento experimental ótimo, e a estimativa de parâmetros.

## 2.6 POSSÍVEIS CONTRIBUIÇÕES DESTA TESE

Muitos estudos sobre a estimativa de parâmetros podem ser encontrados na literatura para as mais diversas aplicações teóricas e práticas. Uma parte deles é aplicada à área da microbiologia preditiva, como discutido nos tópicos anteriores. Entretanto, não foram encontrados estudos da estimativa de parâmetros do crescimento de micro-organismos deteriorantes de alimentos utilizando o DEO.

Os experimentos para a obtenção dos parâmetros do crescimento de micro-organismos deteriorantes em condições isotérmicas (MDE) em temperaturas de refrigeração, próximas da temperatura mínima de crescimento, são os mais demorados e caros para serem obtidos. Nestas condições, a velocidade de crescimento dos micro-organismos é muito baixa, sendo necessário acompanhar o crescimento microbiano com a coleta de dados experimentais até que se atinja a fase estacionária. É importante destacar que são necessários vários experimentos em toda a faixa de temperatura de refrigeração para obter um modelo secundário robusto. Assim, os estudos que têm sido realizados na literatura para a obtenção dos parâmetros de crescimento de micro-organismos deteriorantes de alimentos demandaram um longo tempo experimental e uma grande quantidade de dados experimentais.

A utilização do DEO proposta nesta tese para a estimativa dos parâmetros de crescimento de micro-organismos deteriorantes de alimentos visa contribuir com a minimização do esforço laboral e do custo experimental, além de buscar a estimativa de parâmetros com menor incerteza. No DEO, os experimentos são delineados para condições não-isotérmicas ótimas, sendo possível avaliar o crescimento microbiano em toda a faixa de temperatura de refrigeração, com poucos experimentos.

Esta tese visa também encorajar os pesquisadores a buscar e utilizar métodos alternativos mais eficientes para a estimativa de parâmetros. No DEO, a modelagem matemática muitas vezes é complexa e desencoraja os pesquisadores. Nesta tese, as principais etapas da modelagem matemática são descritas em detalhes para facilitar a aplicação do DEO para outros casos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DADOS EXPERIMENTAIS DO CRESCIMENTO DE *W. viridescens*

Os procedimentos experimentais e a obtenção dos dados cinéticos de crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo e em presunto para esta tese de doutorado seguiram os padrões das pesquisas realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (EngeBio/UFSC) e foram realizados por Ana Paula Rosa da Silva Camargo (tese de doutorado), Wiaslan Figueiredo Martins (dissertação de mestrado) e Nathália Buss da Silva (dissertação de mestrado). Nos tópicos abaixo serão apresentados os principais procedimentos experimentais para obtenção dos dados, sendo que maiores detalhes podem ser encontrados nos trabalhos de origem dos dados experimentais (CAMARGO, 2015; SILVA, 2015; MARTINS, 2015).

##### 3.1.1 Micro-organismo e meios de cultivo

A bactéria ácido-láctica da espécie *W. viridescens* (CCT 5843 ATCC 12706, Lote 22.07) foi adquirida na forma liofilizada da coleção de culturas da Fundação Tropical de Culturas André Tosello (Campinas, Brasil). As cepas foram reidratadas conforme indicação e cultivadas em meio de cultivo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) (Difco Laboratories, Detroit, EUA). As cepas foram estocadas em tubos *ependorf* com meio MRS contendo 20% de glicerol a -24 °C até a utilização. A reativação da cultura pura de *W. viridescens* para o preparo dos inóculos foi realizada em meio MRS a 30 °C por 18 horas, sendo que esse tempo foi estabelecido a partir de estudos prévios que indicaram que a bactéria se encontra no início da fase estacionária.

Os dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo MRS em condições isotérmicas foram obtidos por Ana Paula Rosa da Silva Camargo, e em condições não-isotérmicas foram obtidos por Wiaslan Figueiredo Martins. De forma resumida, as amostras foram preparadas utilizando frascos Erlenmeyers de 400 mL, com volume útil de 320 mL de meio MRS e com 1% (v/v) de inóculo ( $10^5$  UFC/mL), correspondendo a aproximadamente  $10^3$  UFC/mL como concentração inicial. O crescimento microbiano foi acompanhado em duplicata através de medidas de plaqueamento (UFC/mL) até a fase estacionária.

Os dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em presunto em condições não-isotérmicas foram obtidos por Nathália Buss da Silva. De forma resumida, as amostras foram preparadas com duas fatias de presunto (marca Seara, sem capa de gordura) com 1,5 mm de espessura cada (totalizando 20 gramas) acrescentadas de 1 mL de inóculo ( $6 \times 10^4$  UFC/g) espalhado entre as fatias. Medidas de pH, atividade de água e cloreto de sódio foram realizadas para garantir a padronização das amostras. As amostras foram embaladas à vácuo em embalagens esterilizadas, e então incubadas em estufa B.O.D. O crescimento microbiano foi acompanhado em duplicata através de medidas de plaqueamento (UFC/g) até a fase estacionária.

### 3.1.2 Condições isotérmicas

Os dados experimentais da cinética de crescimento de *W. viridescens* em condições isotérmicas foram obtidos nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C. Os experimentos resultaram em duas curvas cinéticas do crescimento em cada temperatura, sendo que cada dado experimental foi obtido em duplicata. Para os seis experimentos isotérmicos foi realizada uma repetição (totalizando doze experimentos).

### 3.1.3 Condições não-isotérmicas

Os experimentos não-isotérmicos em meio de cultivo foram divididos em duas modalidades, sendo experimentos não-otimizados com mudanças entre dois platôs de temperatura de refrigeração, e experimentos ótimos delineados com o DEO.

Os experimentos não-otimizados em meio de cultivo foram realizados para quatro diferentes perfis de temperatura, com variações entre platôs de temperatura. Os delineamentos dos perfis não-otimizados visam simular a temperatura de alimentos refrigerados que foram submetidos a diferentes condições de refrigeração (por exemplo, com acionamento e desligamento periódico do refrigerador). Os perfis foram codificados por NOT<sub>5-11(24h)</sub> (variação entre 5 e 11 °C, com mudança de temperatura a cada 24 horas), NOT<sub>5-11(12h)</sub> (variação entre 5 e 11 °C, com mudança de temperatura a cada 12 horas), NOT<sub>5-8(12h)</sub> (variação entre 5 e 8 °C, com mudança de temperatura a cada 12 horas) e NOT<sub>3-10(12h)</sub> (variação entre 3 e 10 °C, com mudança de temperatura a cada 12 horas). Os dados experimentais para o NOT<sub>5-11(24h)</sub> e NOT<sub>5-11(12h)</sub> foram obtidos a cada 24 horas; para o NOT<sub>5-8(12h)</sub> e NOT<sub>3-10(12h)</sub> foram obtidos a cada 12

horas nas primeiras 60 horas, e depois a cada 24 horas até o fim do experimento. Todos os experimentos foram conduzidos até atingir a fase estacionária.

Nos experimentos delineados de forma ótima em meio de cultivo, dois perfis de temperatura avaliaram o aumento de temperatura entre os platôs (DEO<sub>4-8-12-16</sub> e DEO<sub>12-16-20-25</sub>), dois perfis avaliaram a diminuição de temperatura entre os platôs (DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>), e um perfil avaliou a diminuição seguida do aumento de temperatura entre os platôs (DEO<sub>12-8-4-8-12</sub>). A amplitude máxima de 5 °C entre platôs foi levada em consideração para evitar possíveis fases de adaptação intermediárias. Os tempos da mudança entre as temperaturas de cada platô (chamados de  $t_{shift}$ ) foram otimizados no procedimento de otimização, os quais serão apresentados nos resultados. As temperaturas testadas em cada um dos delineamentos são apresentadas na Tabela 3.1. Os perfis de temperatura foram delineados de forma sequencial, seguindo a ordem de cima para baixo da Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Definição dos platôs de temperatura dos experimentos delineados de forma ótima.

<b>Experimento</b>	<b>T<sub>1</sub></b> (°C)	<b>T<sub>2</sub></b> (°C)	<b>T<sub>3</sub></b> (°C)	<b>T<sub>4</sub></b> (°C)	<b>T<sub>5</sub></b> (°C)	<b>T<sub>6</sub></b> (°C)
DEO <sub>4-8-12-16</sub>	4	8	12	16		
DEO <sub>12-16-20-25</sub>	12	16	20	25		
DEO <sub>16-12-8-4</sub>	16	12	8	4		
DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub>	25	20	16	12	8	4
DEO <sub>12-8-4-8-12</sub>	12	8	4	8	12	

Os parâmetros nominais considerados no DEO foram os parâmetros obtidos na MDE. Se não houvessem estimativas prévias dos valores dos parâmetros, seria recomendável obter estimativas a partir da literatura ou realizando alguns experimentos preliminares. Os tempos ótimos para mudança entre as diferentes temperaturas definidas com o DEO compõem os resultados, sendo que maiores detalhes serão abordados no item 4.4.2.

No perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub>, o objetivo foi analisar o crescimento microbiano partindo uma temperatura de incubação baixa (4 °C), com aumentos da temperatura em platôs de 4 °C (até atingir 16 °C). No perfil DEO<sub>12-16-20-25</sub>, o objetivo foi analisar o crescimento microbiano partindo uma temperatura de incubação moderada (12 °C), com dois aumentos da temperatura em platôs de 4 °C e, por último, um aumento de 5 °C (até

atingir 25 °C). No perfil DEO<sub>16-12-8-4</sub>, o objetivo foi analisar o crescimento microbiano partindo uma temperatura de incubação moderada (16 °C), com diminuição da temperatura em platôs de 4 °C (até atingir 4 °C). No perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>, o objetivo foi analisar o crescimento microbiano partindo uma temperatura de incubação próxima da ótima (25 °C), com uma diminuição da temperatura em platô de 5 °C e quatro diminuições em platôs de 4 °C (até atingir 4 °C). No perfil DEO<sub>12-8-4-8-12</sub>, o objetivo foi analisar o crescimento microbiano partindo uma temperatura de incubação moderada (12 °C), com duas diminuições da temperatura em platôs de 4 °C (até atingir 4 °C) e posteriormente com dois aumentos da temperatura em platôs de 4 °C (até voltar a atingir 12 °C). O perfil DEO<sub>12-8-4-8-12</sub> com a característica de diminuições e aumentos de temperatura foi utilizado para validação dos parâmetros dos modelos matemáticos obtidos nos outros perfis de temperatura.

Os dados experimentais foram obtidos de forma sistemática nos experimentos: um dado no início do experimento (tempo zero); pelo menos três dados em cada temperatura, sendo um deles no momento da mudança de temperatura e os demais de forma distribuída ao longo do tempo; e pelo menos dois dados na fase estacionária. Portanto, seguindo esta sistemática, é possível garantir que haverá dados experimentais disponíveis nas principais fases do crescimento microbiano.

Os cinco experimentos delineados de forma ótima (pontos de coleta e perfis de temperatura) realizados em meio de cultivo foram realizados também em presunto. Os experimentos foram realizados em momentos distintos no meio de cultivo e no presunto. Para diferenciar os resultados obtidos no meio de cultivo e no presunto, todos os resultados obtidos no presunto foram adicionados do subscrito pres (por exemplo, perfil DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>).

Todos os experimentos foram realizados em estufa incubadora (B.O.D.) com controle de temperatura (Dist, Florianópolis, Brasil), sendo que a temperatura do ambiente interno da estufa foi registrada em *datalogger* previamente calibrados (com resolução de 0,1 °C) a cada cinco minutos. O *datalogger* foi posicionado no meio da prateleira superior da incubadora, ao lado das amostras incubadas. Os dados registrados da temperatura de cada experimento foram utilizados na discretização dos modelos matemáticos para a estimativa dos parâmetros e para as predições do crescimento microbiano.

O pH das amostras foi monitorado ao longo dos experimentos. O pH do meio de cultivo foi monitorado por imersão na amostra utilizando um pHmetro para líquidos (pH-metro V620, Analion, Ribeirão Preto,

Brasil), e o pH do presunto foi medido em três diferentes pontos de cada amostra utilizando um pHmetro para sólidos (TESTO, modelo 205, Campinas, Brasil). Os pHmetros foram previamente calibrados, com resolução de 0,01.

## 3.2 MODELOS MATEMÁTICOS

O modelo primário de Baranyi e Roberts, descrito em detalhes no item 2.3.1, foi utilizado para descrever o crescimento de *W. viridescens* em condições isotérmicas e não-isotérmicas. O modelo secundário da Raiz Quadrada, descrito no item 2.3.2, foi utilizado para descrever a dependência do parâmetro  $\mu_{max}$  com a temperatura. A média aritmética dos valores do parâmetro  $h_0$  nas diferentes temperaturas foi utilizada como modelo secundário.

## 3.3 MÉTODOS MATEMÁTICOS PARA A ESTIMATIVA DE PARÂMETROS

Os fundamentos básicos da estimativa de parâmetros em cada abordagem foram abordados no tópico 2.4. Portanto, os métodos matemáticos para a estimativa de parâmetros serão apresentados de forma objetiva a seguir. Na Tabela 3.2 estão apresentadas resumidamente as etapas experimentais e de modelagem necessárias para a estimativa de parâmetros em cada abordagem. Os índices estatísticos apresentados no item 2.3.3 (*RMSE*,  $R^2$ , *IC* e *IP*) foram computados para todas as abordagens utilizadas. Os valores nominais (ou iniciais) dos parâmetros foram obtidos a partir de informações prévias ou observação das curvas experimentais.

### 3.3.1 Estimativa de parâmetros com MDE

Na primeira etapa da MDE, as Equações (2.9) e (2.12) do modelo primário de Baranyi e Roberts foram ajustadas aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* para cada uma das condições isotérmicas (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C, conforme apresentado no item 3.1.2). Os resultados dos ajustes em cada temperatura foram os valores dos parâmetros de crescimento  $\mu_{max}$ ,  $h_0$ ,  $y_{max}$  e  $y_0$ . O valor da média aritmética do parâmetro  $h_0$  foi calculado (que é definido como o estado fisiológico inicial das células), sendo que esse valor médio do parâmetro foi fixo, e

os demais parâmetros do modelo ( $\mu_{max}$ ,  $y_{max}$  e  $y_0$ ) foram estimados novamente pelo ajuste do modelo aos dados experimentais.

Na segunda etapa de modelagem com MDE, o modelo secundário da Raiz Quadrada foi ajustado aos valores do parâmetro  $\mu_{max}$  e a média aritmética do parâmetro  $y_{max}$  foi calculada (conforme apresentado no item 3.2).

Os ajustes dos modelos matemáticos na MDE foram realizados com o *software* Matlab R2011a, versão 7.12.0 (Mathworks, Natick, USA), com o uso do *toolbox cftool* (*curve fitting toolbox*).

Tabela 3.2 – Etapas experimentais e de modelagem matemática necessárias para a estimativa de parâmetros em cada abordagem.

<b>Modelagem em Duas Etapas (MDE)</b>	<b>Modelagem em Uma Etapa (MUE)</b>	<b>Delineamento Experimental Ótimo (DEO)</b>
<u>Experimentos:</u> isotérmicos	<u>Experimentos:</u> isotérmicos e/ou não-isotérmicos	<u>Modelagem:</u> Análises prévias (Monte Carlo) <sup>a</sup> e delineamento dos perfis ótimos <sup>b</sup>
<u>Modelagem<sup>a</sup>:</u> ajuste do modelo primário (1 <sup>a</sup> etapa)	<u>Modelagem<sup>b</sup>:</u> ajuste dos modelos primário e secundário	<u>Experimentos:</u> não-isotérmicos ótimos
<u>Modelagem<sup>a</sup>:</u> ajuste do modelo secundário (2 <sup>a</sup> etapa)		<u>Modelagem<sup>b</sup>:</u> ajuste dos modelos primário e secundário

<sup>a</sup>Utilização do Matlab R2011a.

<sup>b</sup>Utilização do Office Excel 2010.

### 3.3.2 Estimativa de parâmetros com MUE para dados isotérmicos (MUE<sub>iso</sub>) e para dados não-isotérmicos (MUE<sub>nao</sub>)

As Equações (2.7) e (2.8) do modelo primário de Baranyi e Roberts e a Equação (2.14) do modelo secundário da Raiz Quadrada foram ajustados simultaneamente aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* nas diferentes condições experimentais para estimar os valores dos parâmetros  $y_{max}$ ,  $h_0$ ,  $b$  e  $T_{min}$ . O valor de  $y_0$  para cada temperatura foi considerado igual ao valor inicial obtido experimentalmente.

Na  $MUE_{iso}$ , os modelos foram ajustados aos dados do crescimento microbiano em condições isotérmicas (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C, conforme apresentado no item 3.1.2), enquanto que na  $MUE_{nao}$  os modelos foram ajustados aos dados em condições não-isotérmicas não-ótimas (conforme apresentado no item 3.1.3). Para ambas  $MUE_{iso}$  e  $MUE_{nao}$ , os parâmetros foram estimados com o *software Office Excel* 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA), sendo que foi programada a resolução das equações diferenciais através do método de Runge-Kutta de quarta ordem, e a minimização da função objetivo (*RMSE*) foi obtida através da ferramenta *Solver* com o algoritmo GRG. Na resolução das equações diferenciais para a  $MUE_{iso}$ , a temperatura de cada experimento foi considerada constante, enquanto que para a  $MUE_{nao}$ , os dados da temperatura obtidos em cada experimento foram computados na discretização das equações diferenciais. Todos os ajustes dos modelos aos dados experimentais foram realizados cinco vezes (para verificação de possíveis soluções em mínimos locais), sendo que em cada tentativa os valores iniciais dos parâmetros foram obtidos aleatoriamente com a função “aleatório” do *software Office Excel* 2010.

### 3.3.3 Análise de Monte Carlo

Simulações preliminares de experimentos não-isotérmicos foram realizadas para avaliar o efeito de diferentes perfis de temperatura ótimos sobre os parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  do modelo secundário da Raiz Quadrada. As simulações foram realizadas através da análise de Monte Carlo com 500 repetições utilizando o módulo *AMIGO\_RIdent* do toolbox *AMIGO* (IIM-CSIS, Vigo, Espanha). Os resultados obtidos foram os valores estimados para os parâmetros ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) após as 500 repetições, indicando a incerteza sobre os parâmetros  $b$  e  $T_{min}$ . Para todas as simulações foram considerados: (i) o logaritmo da concentração inicial ( $y_0$ ) = 8,00, (ii) o logaritmo da população máxima atingida ( $y_{max}$ ) = 21,09, (iii) o estado fisiológico das células ( $h_0$ ) = 0,0629, (iv) os parâmetros nominais  $b = 0,029 \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,33 \text{ } ^\circ\text{C}$ , e (v) o desvio padrão do logaritmo da concentração microbiana = 0,106 (valores baseados nos dados experimentais em meio de cultivo).

As simulações foram realizadas para diferentes perfis de temperatura ótimos, com aumento de temperatura em platôs. Os tempos para mudança entre as temperaturas e o tempo final do experimento foram delineados de forma ótima. Para cada parâmetro ( $b$  e  $T_{min}$ ), duas simulações representativas das demais simulações foram selecionadas e

apresentadas. Para o parâmetro  $T_{min}$ , os perfis MC<sub>4-8-12</sub> (incubação a 4 °C, com mudança para 8 °C e 12 °C) e MC<sub>20-25-30</sub> (incubação a 20 °C, com mudança para 25 °C e 30 °C). Para o parâmetro  $b$ , os perfis MC<sub>4-8-12</sub> (incubação a 4 °C, com mudança para 8 °C e 12 °C) e MC<sub>4-8-12-16-20</sub> (incubação a 4 °C, com mudanças para 8 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C).

### 3.3.4 Estimativa de parâmetros com DEO

As Equações (2.7) e (2.8) do modelo primário de Baranyi e Roberts e a Equação (2.14) do modelo secundário da Raiz Quadrada foram utilizados para a estimativa dos parâmetros de crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo e presunto com DEO.

Os delineamentos experimentais ótimos preliminares foram obtidos utilizando o *software* Matlab R2011a, versão 7.12.0 (Natick, USA) e o módulo *AMIGO\_OED* (módulo de delineamento experimental ótimo) do *toolbox AMIGO* (IIM-CSIC, Vigo, Espanha). O *toolbox AMIGO* utiliza o método de Runge-Kutta de quarta e quinta ordem (função *ode45* do Matlab) para resolver de forma numérica o sistema de equações diferenciais composto pelos modelos de Baranyi e Roberts e da Raiz Quadrada, e o algoritmo de otimização *SSm* para minimizar o critério E- modificado da *MIF*, Equação (2.23).

Os delineamentos ótimos para obtenção dos dados experimentais em condições não-isotérmicas foram programados no *software Microsoft Excel* 2010 (Redmond, WA, USA). A resolução numérica do sistema de equações diferenciais composto pelos modelos de Baranyi e Roberts e da Raiz Quadrada foi realizada através do método de Runge-Kutta de quarta ordem, e a otimização da *MIF* ( $\Lambda(MIF)$ ) foi obtida utilizando o critério E- modificado, conforme a Equação (3.1) utilizando o *software Microsoft Excel* com a ferramenta *Solver* e o algoritmo GRG, sendo que  $\tau_{max}$  e  $\tau_{min}$  são o maior e o menor autovalor da *MIF*, respectivamente.

$$\Lambda(MIF) = \min \left[ \begin{array}{c} \tau_{max}(MIF) \\ \tau_{min}(MIF) \end{array} \right] \quad (3.1)$$

A *MIF* foi computada utilizando o conceito de funções de sensibilidade relativas introduzida por Munack (1991), conforme a Equação (3.2), sendo que esse conceito tem sido utilizado por outros autores (BERNAERTS; VERSYCK; VAN IMPE, 2000; BERNAERTS et al., 2002) para modelos matemáticos que possuem parâmetros com ordem de grandeza diferentes. Com esse conceito introduz-se na *MIF* a multiplicação dos parâmetros nominais nas funções de sensibilidade (para

suavizar a diferença na ordem de grandeza dos parâmetros) e a resposta do modelo (devido a sua importância relativa ao longo do experimento).

*MIF*

$$= \int_0^{t_f} \frac{1}{(y^0)^2} \begin{bmatrix} (b^0 \frac{\partial y}{\partial b})^2 & (b^0 \frac{\partial y}{\partial b}) \left( T_{min}^0 \frac{\partial y}{\partial T_{min}} \right) \\ (b^0 \frac{\partial y}{\partial b}) \left( T_{min}^0 \frac{\partial y}{\partial T_{min}} \right) & \left( T_{min}^0 \frac{\partial y}{\partial T_{min}} \right)^2 \end{bmatrix} dt \quad (3.2)$$

Para a computação da *MIF*, as sensibilidades das variáveis  $y$  e  $Q$  dos modelos foram obtidas em relação aos parâmetros  $b$  e  $T_{min}$   $\left( \frac{\partial y}{\partial b}, \frac{\partial y}{\partial T_{min}}, \frac{\partial Q}{\partial b}, \frac{\partial Q}{\partial T_{min}} \right)$ . Quando ocorrem variações na temperatura (condições não-isotérmicas) que não podem ser descritas por funções, as funções  $y$  e  $Q$  não podem ser expressas de forma algébrica e, consequentemente, as sensibilidades de  $y$  e  $Q$  em relação aos parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  também não podem ser expressas de forma algébrica. Dessa forma, as Equações (2.7), (2.8) e (2.14) (derivadas de  $y$  e  $Q$  em relação ao tempo, e dependência do parâmetro  $\mu_{max}$  com a temperatura) foram derivadas em relação a  $b$  e são apresentadas nas Equações (3.3), (3.4) e (3.5). As Equações (2.7), (2.8) e (2.14) foram derivadas também em relação a  $T_{min}$  e são apresentadas nas Equações (3.6), (3.7) e (3.8). Posteriormente, as equações foram integradas de forma numérica em função do tempo utilizando o método de Runge-Kutta de quarta ordem, e finalmente resultando nas funções de sensibilidade apresentadas nas Equações (3.9), (3.10), (3.11) e (3.12). As condições iniciais das funções de sensibilidade foram computadas para  $t = 0$  e são apresentadas na Equação (3.13).

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial b} \left( \frac{dy}{dt} \right) &= \frac{d}{dt} \left( \frac{\partial y}{\partial b} \right) \\ &= \left[ \frac{\exp(-Q)}{(1 + \exp(-Q))^2} \right] \left( \frac{\partial Q}{\partial b} \right) \mu_{max} [1 \\ &\quad - \exp(y - y_{max})] \\ &\quad + \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \left( \frac{\partial \mu_{max}}{\partial b} \right) [1 - \exp(y - y_{max})] \\ &\quad - \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \mu_{max} [\exp(y \\ &\quad - y_{max})] \left( \frac{\partial y}{\partial b} \right) \end{aligned} \quad (3.3)$$

$$\frac{\partial}{\partial b} \left( \frac{dQ}{dt} \right) = \frac{d}{dt} \left( \frac{\partial Q}{\partial b} \right) = \frac{\partial \mu_{max}}{\partial b} \quad (3.4)$$

$$\frac{\partial \mu_{max}}{\partial b} = 2b(T - T_{min})^2 \quad (3.5)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial T_{min}} \left( \frac{dy}{dt} \right) &= \frac{d}{dt} \left( \frac{\partial y}{\partial T_{min}} \right) \\ &= \left[ \frac{\exp(-Q)}{(1 + \exp(-Q))^2} \right] \left( \frac{\partial Q}{\partial T_{min}} \right) \mu_{max} [1 \\ &\quad - \exp(y - y_{max})] \\ &+ \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \left( \frac{\partial \mu_{max}}{\partial T_{min}} \right) [1 - \exp(y - y_{max})] \\ &\quad - \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \mu_{max} [\exp(y \\ &\quad - y_{max})] \left( \frac{\partial y}{\partial T_{min}} \right) \end{aligned} \quad (3.6)$$

$$\frac{\partial}{\partial T_{min}} \left( \frac{dQ}{dt} \right) = \frac{d}{dt} \left( \frac{\partial Q}{\partial T_{min}} \right) = \frac{\partial \mu_{max}}{\partial T_{min}} \quad (3.7)$$

$$\frac{\partial \mu_{max}}{\partial T_{min}} = -2b^2(T - T_{min}) \quad (3.8)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial y}{\partial b} &= \int_0^t \left[ \frac{\exp(-Q)}{(1 + \exp(-Q))^2} \right] \left( \frac{\partial Q}{\partial b} \right) \mu_{max} [1 \\ &\quad - \exp(y - y_{max})] dt \\ &+ \int_0^t \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \left( \frac{\partial \mu_{max}}{\partial b} \right) [1 \\ &\quad - \exp(y - y_{max})] dt \\ &- \int_0^t \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \mu_{max} [\exp(y \\ &\quad - y_{max})] \left( \frac{\partial y}{\partial b} \right) dt \end{aligned} \quad (3.9)$$

$$\frac{\partial Q}{\partial b} = \int_0^t 2b(T - T_{min})^2 dt \quad (3.10)$$

$$\begin{aligned}
\frac{\partial y}{\partial T_{min}} = & \int_0^t \left[ \frac{\exp(-Q)}{(1 + \exp(-Q))^2} \right] \left( \frac{\partial Q}{\partial T_{min}} \right) \mu_{max} [1 \\
& - \exp(y - y_{max})] dt \\
& + \int_0^t \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \left( \frac{\partial \mu_{max}}{\partial T_{min}} \right) [1 \\
& - \exp(y - y_{max})] dt \\
& - \int_0^t \left[ \frac{1}{1 + \exp(-Q)} \right] \mu_{max} [\exp(y \\
& - y_{max})] \left( \frac{\partial y}{\partial T_{min}} \right) dt
\end{aligned} \tag{3.11}$$

$$\frac{\partial Q}{\partial T_{min}} = - \int_0^t 2b^2 (T - T_{min}) dt \tag{3.12}$$

$$\frac{\partial y}{\partial b}(0) = \frac{\partial y}{\partial T_{min}}(0) = \frac{\partial Q}{\partial b}(0) = \frac{\partial Q}{\partial T_{min}}(0) = 0 \tag{3.13}$$

As variáveis otimizadas foram os tempos para a mudança entre os platôs de temperaturas (valores de  $t_{shift}$ ) e o tempo total de cada experimento. Os parâmetros nominais ( $b^0$  e  $T_{min}^0$ ) considerados para a computação da *MIF* foram os parâmetros obtidos na MDE.

Os parâmetros estimados com o DEO foram obtidos com o *software Office Excel 2010* seguindo o mesmo procedimento de ajuste dos parâmetros descrito no item 3.3.2.

### 3.3.5 Validação dos parâmetros estimados

A validação dos parâmetros estimados foi realizada com dados experimentais que não foram utilizados na própria estimativa dos parâmetros.

Em meio de cultivo foram realizados experimentos do crescimento microbiano em quinze diferentes condições experimentais (itens 3.1.2 e 3.1.3), sendo que a estimativa dos parâmetros com cada abordagem foi realizada apenas para condições selecionadas (seis condições isotérmicas para MDE e MUE<sub>iso</sub>; quatro condições não-isotérmicas não ótimas para MUE<sub>nao</sub>; e quatro condições não-isotérmicas ótimas para DEO<sub>aum</sub>, DEO<sub>dim</sub> e DEO<sub>aumdim</sub>). As condições experimentais utilizadas para a

estimativa dos parâmetros em uma determinada abordagem não foram utilizadas para as outras abordagens. Portanto, a validação dos parâmetros obtidos na MDE e na  $MUE_{iso}$  pode ser realizada com oito condições experimentais (não-isotérmicas não ótimas e não-isotérmicas ótimas); na  $MUE_{nao}$  com dez condições experimentais (isotérmicas e não-isotérmicas ótimas); e no  $DEO_{aum}$ ,  $DEO_{dim}$  e  $DEO_{aumdim}$  com dez condições experimentais (isotérmicas e não-isotérmicas não ótimas). Além disso, uma condição não-isotérmica ótima foi proposta especialmente para a validação dos parâmetros das diferentes abordagens.

Em presunto, uma condição não-isotérmica ( $DEO_{12-8-4-8-12}$ ) foi utilizada para a validação dos parâmetros das abordagens  $DEO_{aum}$ ,  $DEO_{dim}$  e  $DEO_{aumdim}$ .

Todos os testes de validação foram realizados através da comparação entre os valores preditos do logaritmo da concentração microbiana em função do tempo obtidos nos modelos matemáticos e os valores observados nos experimentos, sendo que os índices estatísticos *RMSE*, *fator tendência* e *fator exatidão* (item 2.3.3) foram calculados para cada conjunto de dados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS DADOS EXPERIMENTAIS

Os valores da concentração microbiana obtidos em cada tempo apresentaram um baixo erro em relação à média (calculado com as medidas em duplicata). O erro em relação à média considerando os dados experimentais em cada duplicata obtidos em meio de cultivo foi de 0,11 e em presunto foi de 0,18 (valores calculados considerando o logaritmo natural da concentração). Em geral, os dados experimentais do crescimento microbiano foram coletados nos tempos delineados, e os valores da temperatura observados nos experimentos foram muito próximos dos valores delineados. Estes resultados são muito importantes, pois os valores experimentais da temperatura são utilizados em todas as rotinas de estimativa de parâmetros e de predição do crescimento microbiano. É importante destacar ainda que os resultados foram obtidos observando os delineamentos propostos com muito rigor, fundamental para a validação dos métodos aplicados e dos resultados obtidos.

O valor do pH inicial do meio de cultivo e do presunto foi próximo de 6,0 e 6,2, respectivamente. Estes valores de pH das amostras apresentaram pequena variação ao longo dos experimentos ( $\pm 0,2$ ) e, por isso, o pH foi considerado um fator constante para todos os experimentos.

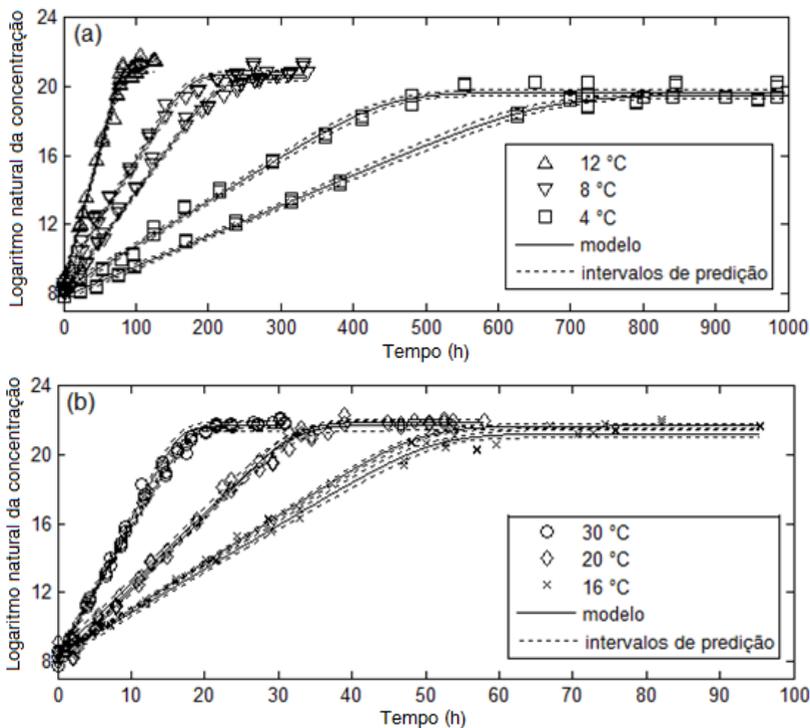
Os principais componentes na composição do meio de cultivo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) são dextrose (20 g/L), agar (12 g/L), peptona proteose (10 g/L), extrato de carne (10 g/L) e extrato de levedura (5 g/L). Os principais componentes na composição do presunto são carne suína (pernil), água, sal, proteína vegetal de soja e açúcar.

### 4.2 PARÂMETROS ESTIMADOS COM MDE EM MEIO DE CULTIVO

Na primeira etapa da MDE, o modelo de Baranyi e Roberts (Equações (2.9) e (2.12)) se ajustou bem aos dados experimentais das cinéticas de crescimento de *W. viridescens* em condições isotérmicas (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C), sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2$  maiores que 0,990 e  $RMSE$  menores que 0,477. Os ajustes do modelo aos dados experimentais nas seis temperaturas são apresentados em dois gráficos na Figura 4.1, sendo que os gráficos foram separados para proporcionar a melhor visualização das curvas de crescimento, pois o

tempo para atingir a fase estacionária nas temperaturas baixas (4, 8 e 12 °C) foi muito maior do que nas temperaturas altas (16, 20 e 30 °C).

Figura 4.1 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo (símbolos) a (a) 4, 8, 12 °C, e a (b) 16, 20 e 30 °C; ajuste do modelo de Baranyi e Roberts obtidos na MDE (linhas contínuas) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas).



O valor médio do parâmetro  $h_0$  para o modelo de Baranyi e Roberts estimado nos ajustes foi de 0,0629 (com erro de 0,14). O valor médio para o parâmetro foi fixo, e então os outros parâmetros do modelo ( $\mu_{max}$ ,  $y_{max}$  e  $y_0$ ) foram ajustados novamente. Os índices estatísticos dos novos ajustes foram  $R^2$  maiores que 0,990 e  $RMSE$  menores que 0,479, os quais foram muito próximos aos valores encontrados nos ajustes anteriores. Os valores dos parâmetros  $\mu_{max}$ ,  $y_0$  e  $y_{max}$  estimados são apresentados na Tabela 4.1. O parâmetro  $h_0$  apresentou desvio padrão = 0,140, o que relativamente corresponde a 2,23 vezes o valor médio do parâmetro, mas não deve ser considerado um parâmetro com elevada incerteza, visto que

o seu valor absoluto ficou muito próximo de zero (o que significa que o micro-organismo está praticamente adaptado ao ambiente) e que a virtual fixação do seu valor somado ou subtraído do desvio padrão não provocaria grandes mudanças na curva de crescimento (o que pode ser observado nos resultados estatísticos acima, com  $h_0$  ajustado e fixo). O parâmetro  $h_0$  normalmente apresenta maior desvio padrão do que os outros parâmetros por estar relacionado com a fase de adaptação do micro-organismo, que é mais difícil de descrever.

Tabela 4.1 – Parâmetros estimados ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) no ajuste do modelo de Baranyi e Roberts aos dados de crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo com MDE.

	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	30 °C
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,018	0,069	0,160	0,254	0,413	0,824
	( $\pm 0,001$ )	( $\pm 0,004$ )	( $\pm 0,005$ )	( $\pm 0,012$ )	( $\pm 0,024$ )	( $\pm 0,047$ )
	0,026	0,057	0,151	0,272	0,435	0,738
	( $\pm 0,001$ )	( $\pm 0,002$ )	( $\pm 0,009$ )	( $\pm 0,008$ )	( $\pm 0,014$ )	( $\pm 0,029$ )
$y_0$	7,80	8,89	8,45	8,31	8,39	8,02
	( $\pm 0,20$ )	( $\pm 0,28$ )	( $\pm 0,21$ )	( $\pm 0,30$ )	( $\pm 0,34$ )	( $\pm 0,40$ )
	8,21	8,16	8,65	8,33	7,76	8,37
	( $\pm 0,24$ )	( $\pm 0,20$ )	( $\pm 0,37$ )	( $\pm 0,19$ )	( $\pm 0,24$ )	( $\pm 0,25$ )
$y_{max}$	19,52	20,72	21,46	21,25	21,73	21,69
	( $\pm 0,16$ )	( $\pm 0,20$ )	( $\pm 0,19$ )	( $\pm 0,23$ )	( $\pm 0,30$ )	( $\pm 0,29$ )
	19,68	20,49	21,18	21,68	21,91	21,76
	( $\pm 0,18$ )	( $\pm 0,18$ )	( $\pm 0,30$ )	( $\pm 0,15$ )	( $\pm 0,19$ )	( $\pm 0,17$ )

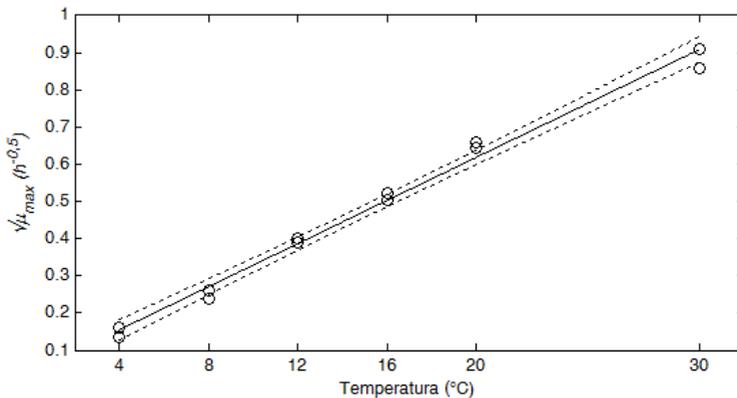
No ajuste do modelo primário, o valor do parâmetro  $y_0$  normalmente é estimado pelo ajuste do modelo matemático aos dados experimentais. Entretanto, o valor de  $y_0$  pode ser também obtido diretamente dos dados experimentais. Se os valores de  $y_0$  estimado e experimental forem diferentes, então o parâmetro  $y_0$  pode impactar nos valores dos outros parâmetros do modelo. Uma análise sobre este aspecto para as condições isotérmicas desta tese é apresentada no Apêndice A.

Para estimar os parâmetros dos modelos primários na MDE foram realizados 12 experimentos (em 6 temperaturas, com repetições), 196 dados experimentais (38 a 4 °C, 41 a 8 °C, 29 a 12 °C, 33 a 16 °C, 28 a 20 °C, 27 a 30 °C) e tempo experimental total de 3.540 horas (2.257 a 4 °C, 668 a 8 °C, 251 a 12 °C, 191 a 16 °C, 112 a 20 °C, 61 a 30 °C). Em um experimento de cinética do crescimento microbiano, quanto menor é a temperatura, maior é o tempo experimental necessário para

obter a curva até a fase estacionária. Esta relação é claramente observada nos resultados acima, em que 64% do tempo experimental total foi utilizado nas cinéticas a 4 °C. Os parâmetros do crescimento microbiano em baixas temperaturas, entretanto, são os mais importantes no estudo da vida útil de alimentos refrigerados, e por isso estes experimentos são indispensáveis para evitar extrapolações.

Na segunda etapa da MDE, o modelo da Raiz Quadrada, Equação (2.14), se ajustou bem aos valores do parâmetro  $\mu_{max}$  em função da temperatura, como pode ser visto na Figura 4.2. Os índices estatísticos  $R^2 = 0,991$  e  $RMSE = 0,026$  confirmaram o bom ajuste do modelo. Os valores dos parâmetros estimados pelo ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) foram  $b = 0,0290 (\pm 0,0020) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,33 (\pm 1,26) \text{ } ^\circ\text{C}$ . Por sua vez, a média aritmética dos valores do parâmetro  $y_{max}$  resultou no valor de 21,09, com desvio padrão = 0,82.

Figura 4.2 – Valores do parâmetro  $\mu_{max}$  (círculos) estimados pelo modelo de Baranyi e Roberts, ajuste do modelo da Raiz Quadrada (linha contínua) e intervalos de predição a 95% (linha tracejada).



Os índices estatísticos  $R^2$  e  $RMSE$  do modelo primário foram recalculados considerando simultaneamente todos os dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* obtidos nas seis temperaturas, os valores dos parâmetros  $y_0$ ,  $y_{max}$  e  $h_0$  estimados na primeira etapa de ajuste, e os valores de  $\mu_{max}$  obtidos no modelo secundário na segunda etapa de ajuste. Este recálculo é necessário para que se possa comparar os índices estatísticos obtidos nas diferentes abordagens. Assim, os índices estatísticos obtidos no recálculo foram  $R^2 = 0,986$  e  $RMSE = 0,581$ .

### 4.3 PARÂMETROS ESTIMADOS COM MUE<sub>iso</sub> E MUE<sub>nao</sub> EM MEIO DE CULTIVO

Na MUE<sub>iso</sub>, os parâmetros dos modelos primário e secundários foram estimados simultaneamente aos dados experimentais das cinéticas de crescimento de *W. viridescens* obtidos a 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C. Os dados experimentais utilizados na MUE<sub>iso</sub> são os mesmos que foram utilizados na MDE, e por isso, a quantidade de experimentos (12), a quantidade de dados experimentais (196) e o tempo experimental total (3.540 horas) também são os mesmos. Os modelos ajustaram-se bem aos dados experimentais, como pode ser visto na Figura 4.3, sendo que os índices estatísticos do ajuste foram  $R^2 = 0,986$  e  $RMSE = 0,575$ .

Na MUE<sub>iso</sub>, os valores de  $y_0$  para cada temperatura foram considerados iguais aos valores iniciais obtidos experimentalmente; e o valor de  $y_{max}$  foi considerado igual a média dos últimos três valores do experimento (foi observado que todas as curvas já estavam na fase estacionária para esses valores). O valor de  $h_0$  foi considerado independente da temperatura, ou seja, um único valor do parâmetro foi encontrado para todos os ajustes, sendo que o valor obtido na estimativa de parâmetros para  $h_0$  foi igual a zero. E os valores dos parâmetros do modelo secundário da Raiz Quadrada ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) estimados através do ajuste na MUE<sub>iso</sub> foram  $b = 0,0297 (\pm 0,0006) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,00 (\pm 0,20) \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Na MUE<sub>nao</sub>, os parâmetros dos modelos primário e secundários foram estimados simultaneamente a partir de dados experimentais dos quatro diferentes perfis de temperatura não-otimizados (perfis NOT<sub>5-11(24h)</sub>, NOT<sub>5-11(12h)</sub>, NOT<sub>5-8(12h)</sub> e NOT<sub>3-10(12h)</sub>). Para estimar os parâmetros dos modelos na MUE<sub>nao</sub> foram necessários os 4 experimentos citados, totalizando 57 dados experimentais (10 no NOT<sub>5-11(24h)</sub>, 10 no NOT<sub>5-11(12h)</sub>, 19 no NOT<sub>5-8(12h)</sub>, 18 no NOT<sub>3-10(12h)</sub>) e tempo experimental total de 1.272 horas (240 no NOT<sub>5-11(24h)</sub>, 264 no NOT<sub>5-11(12h)</sub>, 396 no NOT<sub>5-8(12h)</sub>, 372 no NOT<sub>3-10(12h)</sub>). Os ajustes dos modelos aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em condições não-isotérmicas podem ser vistos na Figura 4.4, Figura 4.5, Figura 4.6 e Figura 4.7, em que os índices estatísticos do ajuste foram insatisfatórios ( $R^2 = 0,945$  e  $RMSE = 1,144$ ). Na MUE<sub>nao</sub>, os valores de  $y_0$  para cada temperatura também foram considerados iguais aos valores iniciais obtidos experimentalmente, e os parâmetros  $y_{max}$  e  $h_0$  foram considerados independentes da temperatura. Os valores encontrados nos ajustes foram  $y_{max} = 20,85$  e  $h_0 = 0,973$ . Os valores dos parâmetros do modelo da Raiz

Quadrada ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) estimados através do ajuste  $MUE_{nao}$  foram  $b = 0,0213 (\pm 0,0099) h^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -4,72 (\pm 5,76) \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Figura 4.3 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo (símbolos) a (a) 4, 8, 12 °C, e a (b) 16, 20 e 30 °C, ajuste do modelo de Baranyi e Roberts obtidos na  $MUE_{iso}$  (linhas contínuas) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas).

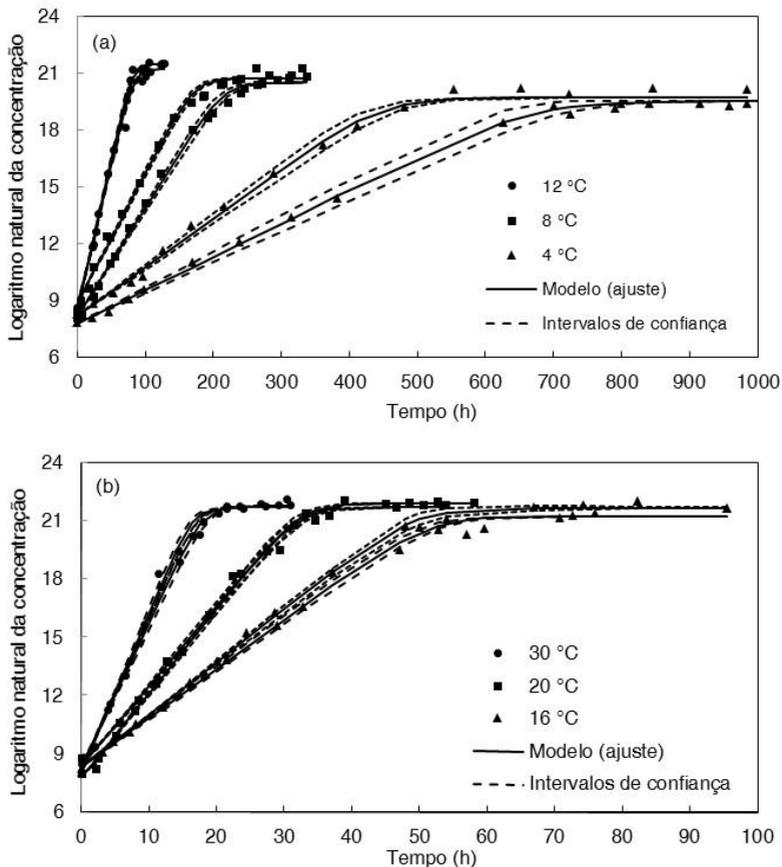


Figura 4.4 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de *W. viridescens* em meio de cultivo para  $NOT_{5-11(24h)}$ : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas).

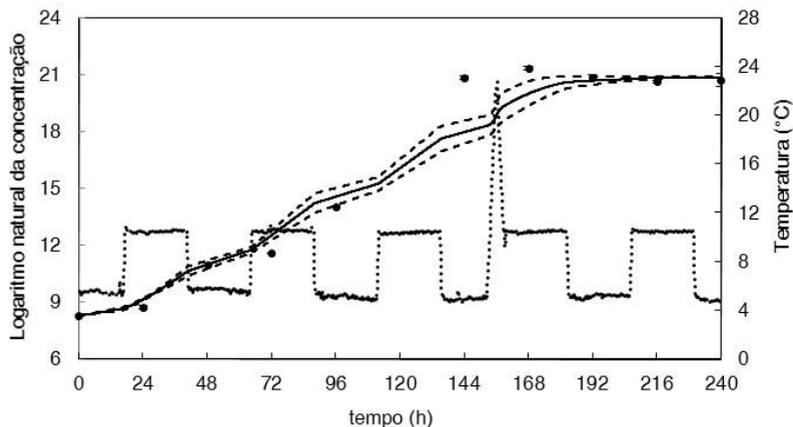


Figura 4.5 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de *W. viridescens* em meio de cultivo para  $NOT_{5-11(12h)}$ : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas).

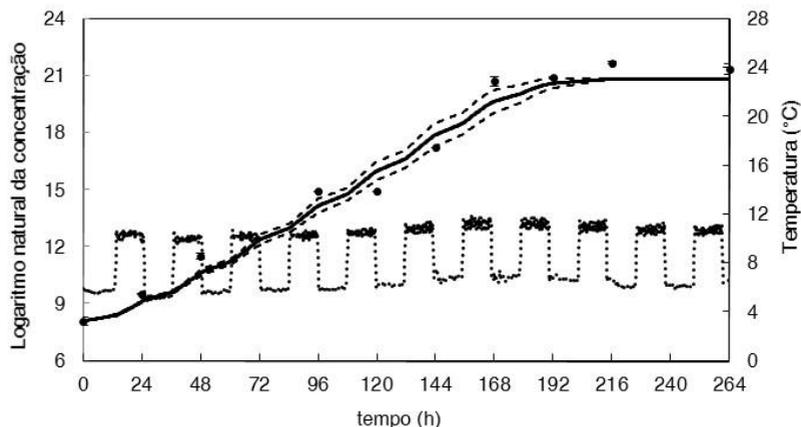


Figura 4.6 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de *W. viridescens* em meio de cultivo para  $NOT_{5-8(12h)}$ : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas).

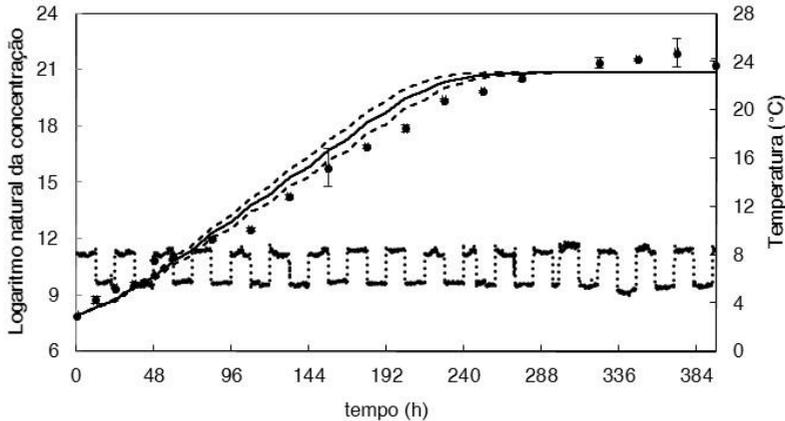
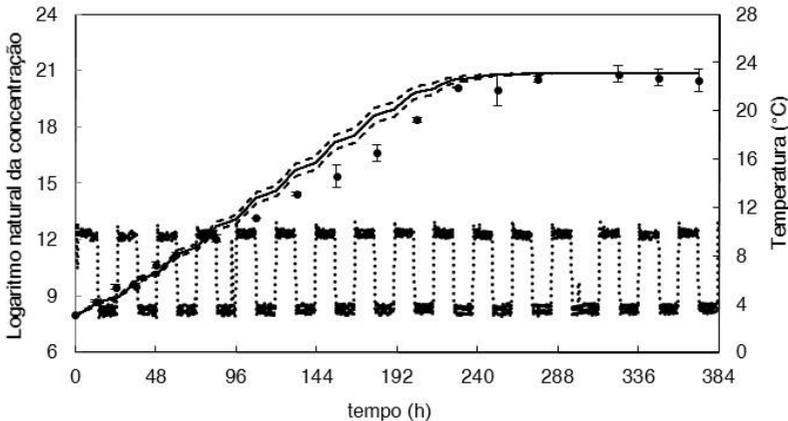


Figura 4.7 – Ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais de *W. viridescens* em meio de cultivo para  $NOT_{3-10(12h)}$ : dados experimentais (círculos), modelo matemático (linha contínua), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição a 95% (linhas tracejadas).



## 4.4 PARÂMETROS ESTIMADOS COM DEO EM MEIO DE CULTIVO

### 4.4.1 Simulações preliminares – Análise de Monte Carlo

Os resultados dos estudos de caso selecionados, conforme descrito no item 3.3.3, serão apresentados a seguir para ilustrar os efeitos causados pelos diferentes perfis de temperatura na incerteza dos parâmetros  $b$  e  $T_{min}$ .

Os tempos ótimos obtidos para a mudança entre as temperaturas para o perfil MC<sub>4-8-12</sub> foram 119,78 horas (de 4 °C para 8 °C) e 147,69 horas (de 8 °C para 12 °C), e tempo final do experimento em 240,00 horas; para o perfil MC<sub>20-25-30</sub>, tempos ótimos obtidos para a mudança entre as temperaturas foram 17,61 horas (de 20 °C para 25 °C) e 22,73 horas (25 °C para 30 °C), e tempo final do experimento em 45,00 horas; e para o perfil MC<sub>4-8-12-16-20</sub>, os tempos ótimos obtidos para a mudança entre as temperaturas foram 60,00 horas (4 °C para 8 °C), 100,00 horas (de 8 °C para 12 °C após), 107,82 horas (de 12 °C para 16 °C) e 161,96 horas (de 16 °C para 20 °C), e tempo final do experimento em 200 horas.

Os resultados da análise de Monte Carlo com 500 repetições indicaram os seguintes valores dos parâmetros ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%):  $b = 0,0291 (\pm 0,0060) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,40 (\pm 2,78) \text{ } ^\circ\text{C}$  para o perfil MC<sub>4-8-12</sub>;  $b = 0,0284 (\pm 0,0039) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -2,24 (\pm 4,88) \text{ } ^\circ\text{C}$  para o perfil MC<sub>20-25-30</sub>; e  $b = 0,0289 (\pm 0,0008) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,50 (\pm 4,03) \text{ } ^\circ\text{C}$  para o perfil MC<sub>4-8-12-16-20</sub>. Em cada análise de Monte Carlo, o tempo de processamento das 500 repetições, com processador Intel® Core™ i3-3110M, CPU de 2,40 GHz e Memória (RAM) de 3,88 GB utilizável, foi de até 4 horas.

De forma geral foi possível observar que a incerteza sobre o parâmetro  $T_{min}$  aumenta à medida que a temperatura de incubação se distancia da temperatura mínima de crescimento do micro-organismo. Nos casos simulados esta observação pode ser verificada pela menor dispersão dos valores de  $T_{min}$  para o perfil MC<sub>4-8-12</sub> em relação ao perfil MC<sub>20-25-30</sub>. Portanto, a incerteza do parâmetro  $T_{min}$  pode ser reduzida realizando experimentos com incubação em temperaturas próximas da temperatura mínima de crescimento do micro-organismo. Em uma análise similar, foi possível observar que a incerteza sobre o parâmetro  $b$  aumenta à medida que a faixa de temperatura diminui. Nos casos simulados esta observação pode ser verificada pela menor dispersão dos valores de  $b$  para o perfil MC<sub>4-8-12-16-20</sub> em relação ao perfil MC<sub>4-8-12</sub>. Portanto, a incerteza

do parâmetro  $b$  pode ser reduzida com o aumento da faixa de temperatura do experimento.

De forma conclusiva foi possível observar nas simulações preliminares realizadas que a incerteza dos parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  pode ser reduzida através do delineamento de experimentos com incubação em temperaturas próximas da temperatura mínima de crescimento, e varrendo a maior faixa possível de temperaturas ao longo do experimento. Na análise de Monte Carlo com 500 repetições para um experimento com estas características (variações da temperatura em platôs: 4, 8, 12, 16 e 20 °C) foi possível observar que a frequência dos valores dos parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  apresentam um formato típico de distribuição gaussiana, sendo que em casos como este a incerteza dos parâmetros geralmente é menor.

O conjunto de delineamentos experimentais ótimos propostos a seguir para obtenção de dados experimentais e estimativa dos parâmetros de crescimento de *W. viridescens* nesta tese, portanto, foram realizados a partir das informações obtidas nessas simulações preliminares, levando em consideração também os graus de liberdade e as restrições de cada experimento.

#### 4.4.2 Resultados obtidos no DEO em meio de cultivo

No delineamento experimental do primeiro perfil com aumento na temperatura (DEO<sub>4-8-12-16</sub>), a incubação ocorreu a 4 °C, com aumento de temperatura para 8 °C, 12 °C e 16 °C. A otimização da *MIF* para o perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub> com o critério E- modificado resultou em  $A(MIF) = 783,7$ , sendo que os tempos ótimos para as mudanças de temperatura obtidos foram 63,0 horas (de 4 para 8 °C), 91,5 horas (de 8 para 12 °C) e 105,0 horas (de 12 para 16 °C), e o tempo total do experimento obtido foi de 168,0 horas. Para o perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub> foi delineada a coleta de 14 dados experimentais. Para todos os experimentos delineados de forma ótima, a coleta de dados proposta foi sistemática, conforme apresentado na seção 3.1.3, com coleta de um dado no início do experimento (tempo zero); pelo menos três dados em cada temperatura, sendo um deles no momento da mudança de temperatura e os demais de forma distribuída ao longo do tempo; e pelo menos dois dados na fase estacionária. O perfil de temperatura delineado (teórico), a simulação do crescimento microbiano e os tempos de coleta dos dados experimentais são apresentados na Figura 4.8. O tempo de processamento para obtenção dos perfis ótimos, para todos os casos, com processador Intel® Core™ i3-3110M, CPU de 2,40 GHz e Memória (RAM) de 3,88 GB utilizável, foi menor que uma hora.

Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub>, o modelo matemático se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,996$  e  $RMSE = 0,280$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0270 (\pm 0,0050) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,00 (\pm 1,66) \text{ } ^\circ\text{C}$ . Na Figura 4.9 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub>, a temperatura experimental e os intervalos de predição do modelo matemático a 95%.

No delineamento experimental do segundo perfil com aumento na temperatura (DEO<sub>12-16-20-25</sub>), a incubação ocorreu a 12 °C, com aumento de temperatura para 16 °C, 20 °C e 25 °C. A otimização da *MIF* para o perfil DEO<sub>12-16-20-25</sub> com o critério E- modificado resultou em  $\lambda(MIF) = 20786,4$ , sendo que os tempos ótimos para as mudanças de temperatura obtidos foram 20,08 horas (de 12 para 16 °C), 31,96 horas (de 16 para 20 °C) e 39,8 horas (de 20 para 25 °C), e o tempo total do experimento obtido foi de 60,0 horas. No experimento para o perfil DEO<sub>12-16-20-25</sub> também foram obtidos 14 dados experimentais. O perfil de temperatura delineado (teórico), a simulação do crescimento microbiano e os tempos de coleta dos dados experimentais são apresentados na Figura 4.10.

Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>12-16-20-25</sub>, o modelo matemático também se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,996$  e  $RMSE = 0,272$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0284 (\pm 0,0083) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,52 (\pm 4,84) \text{ } ^\circ\text{C}$ . Na Figura 4.11 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>12-16-20-25</sub>, a temperatura experimental e os intervalos de predição do modelo matemático a 95%.

Figura 4.8 – Perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos selecionados para coleta dos dados experimentais (símbolos).

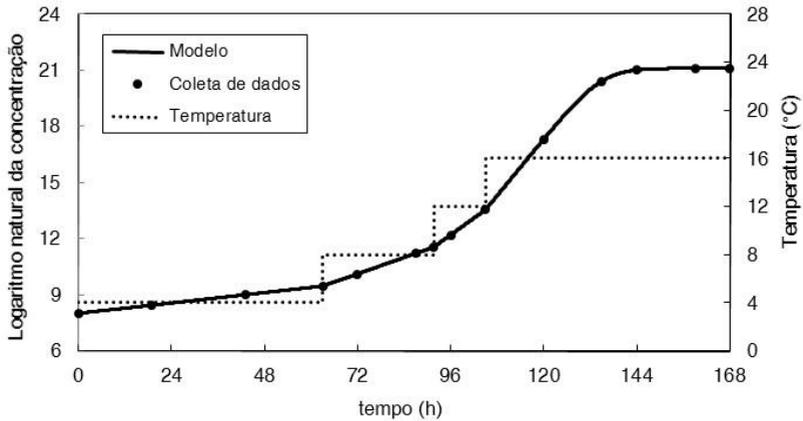


Figura 4.9 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).

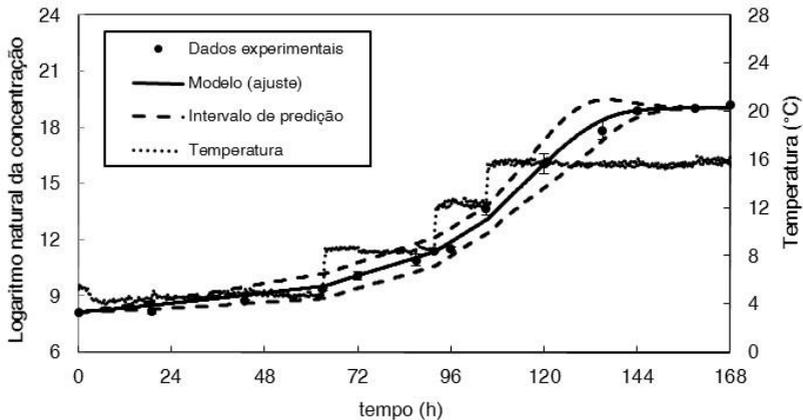


Figura 4.10 – Perfil DEO<sub>12-16-20-25</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos seleccionados para coleta dos dados experimentais (símbolos).

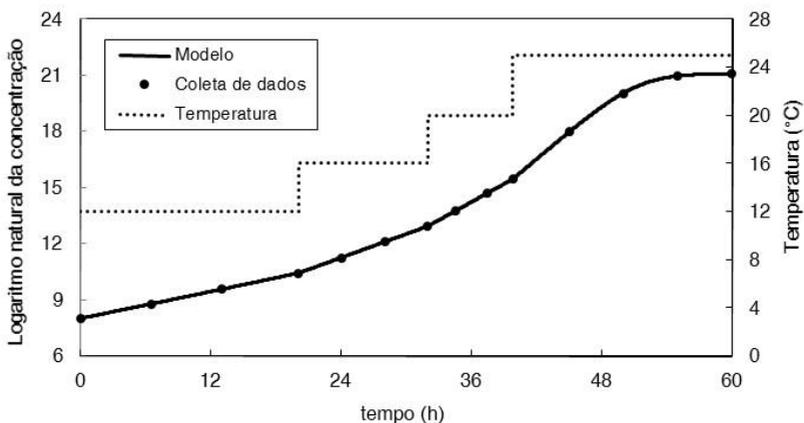
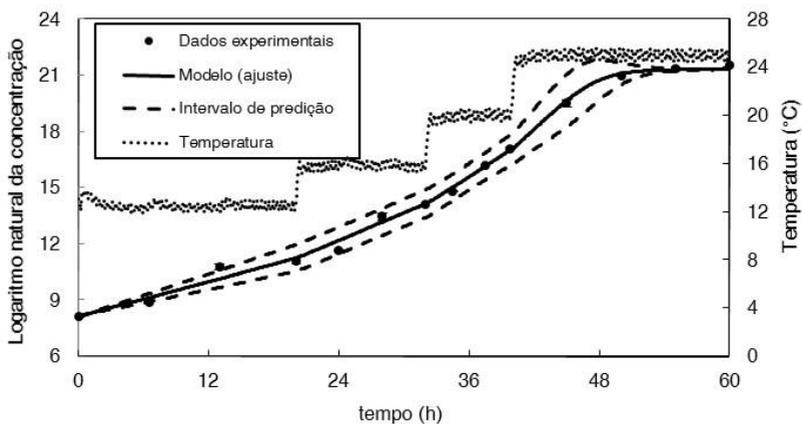
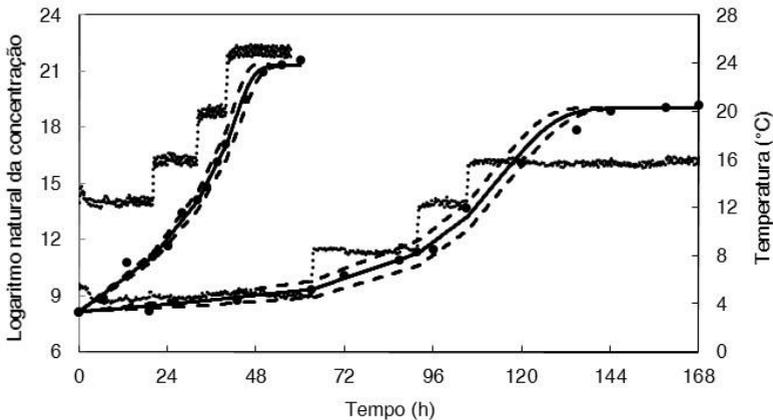


Figura 4.11 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>12-16-20-25</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).



O modelo matemático foi, então, ajustado simultaneamente aos dados experimentais obtidos nos perfis DEO<sub>4-8-12-16</sub> e DEO<sub>12-16-20-25</sub>, compondo o DEO<sub>aum</sub>. O modelo matemático mais uma vez se ajustou bem aos dados experimentais, sendo os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,995$  e  $RMSE = 0,317$ . Os valores estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0314 (\pm 0,0019) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = 0,12 (\pm 0,71) \text{ } ^\circ\text{C}$ . O ajuste simultâneo do modelo matemático aos dados experimentais dos perfis DEO<sub>4-8-12-16</sub> e DEO<sub>12-16-20-25</sub> pode ser visto na Figura 4.12.

Figura 4.12 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* para os perfis DEO<sub>4-8-12-16</sub> e DEO<sub>12-16-20-25</sub>, perfis de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).



No delineamento experimental do primeiro perfil com diminuição na temperatura (DEO<sub>16-12-8-4</sub>), a incubação ocorreu a 16 °C, com diminuição de temperatura para 12 °C, 8 °C e 4 °C. A otimização da *MIF* para o perfil DEO<sub>16-12-8-4</sub> com o critério E- modificado resultou em  $A(MIF) = 2508,6$ , sendo que os tempos ótimos para as mudanças de temperatura obtidos foram 11,88 horas (de 16 para 12 °C), 31,96 horas (de 12 para 8 °C) e 72,94 horas (de 8 para 4 °C), e o tempo total do experimento obtido foi de 192,0 horas. Para o perfil DEO<sub>16-12-8-4</sub> foi delineada a coleta de 14 dados experimentais. O perfil de temperatura delineado (teórico), a simulação do crescimento microbiano e os tempos de coleta dos dados experimentais são apresentados na Figura 4.13.

Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>16-12-8-4</sub>, o modelo matemático se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,997$  e  $RMSE = 0,254$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0316 (\pm 0,0051) \text{ h}^{-0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -0,68 (\pm 2,03) \text{ }^\circ\text{C}$ . Na Figura 4.14 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>16-12-8-4</sub>, a temperatura experimental e os intervalos de predição do modelo matemático a 95%.

No delineamento experimental do segundo perfil com diminuição na temperatura (DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>), a incubação ocorreu a 25 °C, com diminuição de temperatura para 20 °C, 16 °C, 12 °C, 8 °C e 4 °C. A otimização da *MIF* para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> com o critério E-modificado resultou em  $\lambda(MIF) = 40664,8$ , sendo que os tempos ótimos para as mudanças de temperatura obtidos foram 4,29 horas (de 25 para 20 °C), 10,82 horas (de 20 para 16 °C), 20,72 horas (de 16 para 12 °C), 37,45 horas (de 12 para 8 °C) e 71,60 horas (de 8 para 4 °C), e o tempo total do experimento obtido foi de 168,0 horas. Para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> foi delineada a coleta de 18 dados experimentais. O perfil de temperatura delineado (teórico), a simulação do crescimento microbiano e os tempos de coleta dos dados experimentais são apresentados na Figura 4.15.

Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>, o modelo matemático também se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,997$  e  $RMSE = 0,245$ . Os valores estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0291 (\pm 0,0042) \text{ h}^{-0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,84 (\pm 2,88) \text{ }^\circ\text{C}$ . Na Figura 4.16 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>, a temperatura experimental e os intervalos de predição do modelo matemático a 95%.

Figura 4.13 – Perfil DEO<sub>16-12-8-4</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos selecionados para coleta dos dados experimentais (símbolos).

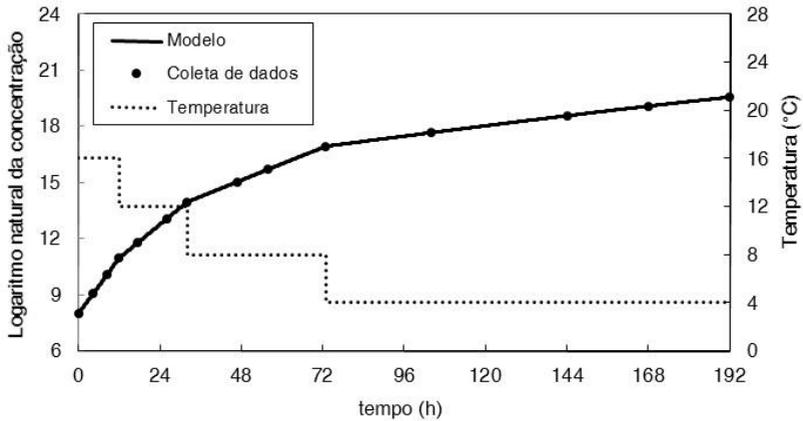


Figura 4.14 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>16-12-8-4</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).

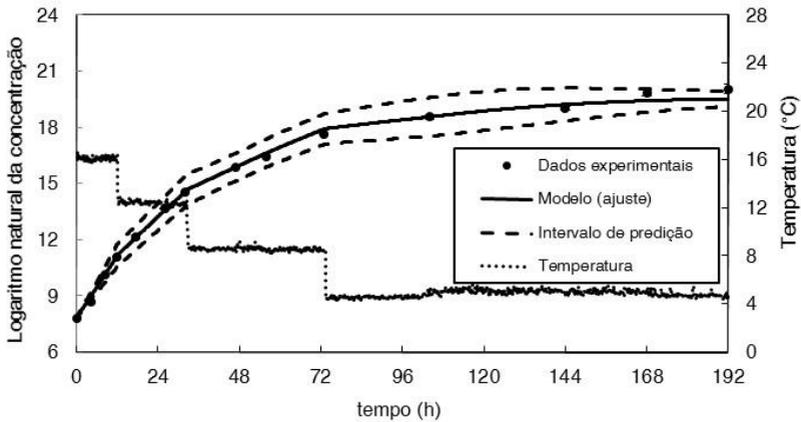


Figura 4.15 – Perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> delineado de forma ótima (linha pontilhada), simulação do crescimento microbiano (linha contínua) e tempos seleccionados para coleta dos dados experimentais (símbolos).

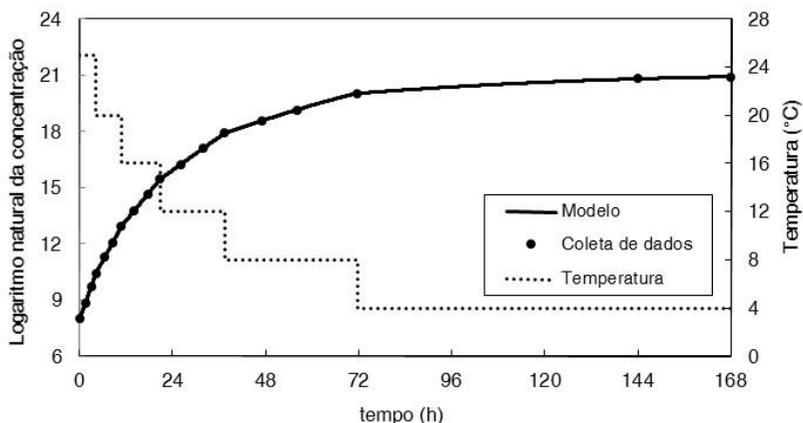
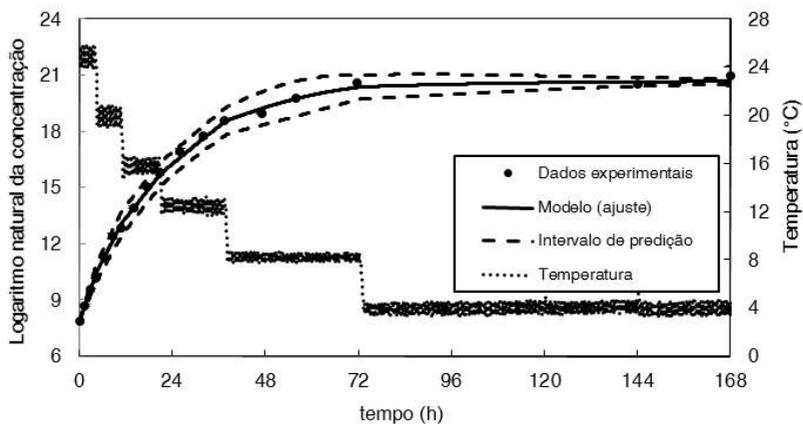
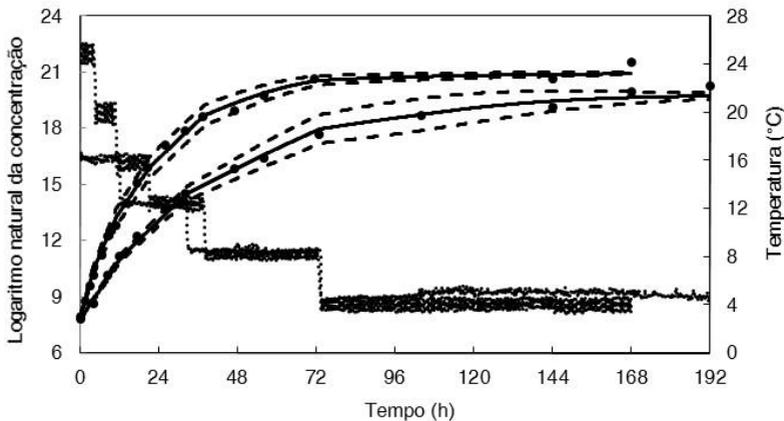


Figura 4.16 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).



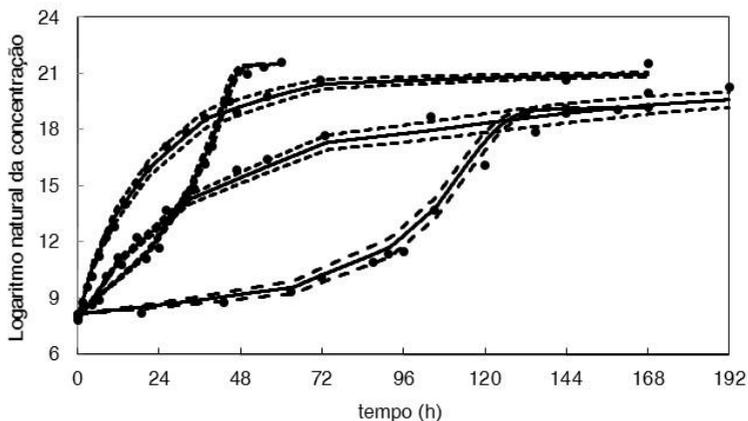
O modelo matemático foi, então, ajustado simultaneamente aos dados experimentais obtidos nos perfis DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>, compondo o DEO<sub>dim</sub>. O modelo matemático mais uma vez se ajustou bem aos dados experimentais, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,999$  e  $RMSE = 0,259$ . Os valores estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0295 (\pm 0,0019) \text{ h}^{-0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,57 (\pm 1,05) \text{ }^\circ\text{C}$ . O ajuste simultâneo do modelo matemático aos dados experimentais dos perfis DEO<sub>4-8-12-16</sub> e DEO<sub>12-16-20-25</sub> pode ser visto na Figura 4.17.

Figura 4.17 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* para os perfis DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>, perfil de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).



O DEO<sub>aumdim</sub> consistiu no ajuste simultâneo dos modelos matemáticos aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo obtidos nos quatro perfis de temperatura (DEO<sub>4-8-12-16</sub>, DEO<sub>12-16-20-25</sub>, DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>). Nesta estimativa de parâmetros, os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,990$  e  $RMSE = 0,436$ , e os valores estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0316 (\pm 0,0013) \text{ h}^{-0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -0,24 (\pm 0,55) \text{ }^\circ\text{C}$ . O ajuste simultâneo do modelo matemático aos dados experimentais dos perfis DEO<sub>4-8-12-16</sub>, DEO<sub>12-16-20-25</sub>, DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> pode ser visto na Figura 4.18.

Figura 4.18 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* para os perfis DEO<sub>4-8-12-16</sub>, DEO<sub>12-16-20-25</sub>, DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).



#### 4.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM MEIO DE CULTIVO

A Tabela 4.2 apresenta de forma comparativa o tempo experimental e a quantidade de dados necessários para a estimativa dos parâmetros dos modelos matemáticos com as abordagens MDE, MUE e DEO para o crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo.

Na Tabela 4.2 podemos observar que os parâmetros com as abordagens MDE e MUE<sub>iso</sub> foram estimados utilizando 196 dados experimentais, enquanto que para as abordagens MUE<sub>nao</sub> e DEO<sub>aumdim</sub> os parâmetros foram estimados utilizando apenas 57 e 60 dados experimentais, respectivamente. Assim, para a estimativa de parâmetros com as abordagens MUE<sub>nao</sub> e DEO<sub>aumdim</sub> foram necessários apenas 29% e 31%, respectivamente, da quantidade de dados experimentais utilizados nas abordagens MDE e MUE<sub>iso</sub>. Além disso, podemos observar que o tempo experimental necessário nas abordagens MDE e MUE<sub>iso</sub> foi de 3540 horas, enquanto que para as abordagens MUE<sub>nao</sub> e DEO<sub>aumdim</sub> o tempo experimental necessário foi de 1272 e 588 horas, respectivamente. Neste caso, para a estimativa de parâmetros com as abordagens MUE<sub>nao</sub> e DEO<sub>aumdim</sub> foram necessários apenas 36% e 17%, respectivamente, do tempo experimental utilizado nas abordagens MDE e MUE<sub>iso</sub>. Portanto, com relação a quantidade de dados e tempo experimental necessários, é

possível concluir que as abordagens  $MUE_{nao}$  e  $DEO_{aumdim}$  apresentaram vantagens para a estimativa de parâmetros dos modelos matemáticos em relação as abordagens MDE e  $MUE_{iso}$ .

Tabela 4.2 – Tempo experimental e quantidade de dados experimentais necessários para a estimativa dos parâmetros dos modelos matemáticos com as abordagens MDE, MUE e DEO em meio de cultivo.

<b>Abordagem</b>	<b>Temperatura/Perfil</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Dados</b>
MDE	4	1272	19
		985	19
	8	330	21
		338	20
	12	124	15
		127	14
	16	96	18
		95	15
	20	54	12
		58	16
30	30	13	
	31	14	
	<i>(Total MDE)</i>	3540	196
$MUE_{iso}$	<i>(Total <math>MUE_{iso}</math>)</i>	3540	196
$MUE_{nao}$	NOT <sub>5-11</sub> (24h)	240	10
	NOT <sub>5-11</sub> (12h)	264	10
	NOT <sub>5-8</sub> (12h)	396	19
	NOT <sub>3-10</sub> (12h)	372	18
	<i>(Total <math>MUE_{nao}</math>)</i>	1272	57
DEO	DEO <sub>4-8-12-16</sub>	168	14
	DEO <sub>12-16-20-25</sub>	60	14
	<i>(Subtotal <math>DEO_{aum}</math>)</i>	228	28
	DEO <sub>16-12-8-4</sub>	192	14
	DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub>	168	18
	<i>(Subtotal <math>DEO_{dim}</math>)</i>	360	32
	<i>(Total <math>DEO_{aumdim}</math>)</i>	588	60

Os experimentos para obtenção dos parâmetros do crescimento microbiano em condições isotérmicas (MDE), em temperaturas de refrigeração, próximas da temperatura mínima de crescimento, são os mais demorados (64% do tempo total da MDE foi utilizado apenas para o experimento a 4 °C), como pode ser visto na Tabela 4.2. Nestas

condições, a velocidade de crescimento dos micro-organismos é muito baixa, sendo necessário acompanhar o crescimento microbiano com a coleta de dados experimentais até que se atinja a fase estacionária. Além disso, são necessários vários experimentos na faixa de temperatura de refrigeração, para obter um modelo secundário robusto. Portanto, os estudos para a obtenção dos parâmetros de crescimento microbiano demandam um longo tempo experimental e uma grande quantidade de dados experimentais.

No DEO, os experimentos são delineados para condições não-isotérmicas ótimas, sendo possível avaliar o crescimento microbiano em toda a faixa de temperatura de refrigeração, com poucos experimentos, ou até mesmo em um único experimento (por exemplo, o perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub>). Portanto, o DEO demanda tempo reduzido e menor quantidade de dados experimentais quando comparado às outras abordagens.

A Tabela 4.3 apresenta de forma comparativa os valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) e os índices estatísticos ( $R^2$  e  $RMSE$ ) resultante dos ajustes dos modelos matemáticos com as abordagens MDE, MUE e DEO para o crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo.

Os parâmetros estimados com  $MUE_{iso}$  apresentaram valores próximos dos parâmetros obtidos com MDE, porém os intervalos de confiança dos parâmetros foram menores na  $MUE_{iso}$  do que na MDE. Os índices estatísticos também foram muito próximos nas duas abordagens. Portanto, utilizando o mesmo conjunto de dados experimentais, foi possível obter os parâmetros com menor incerteza com  $MUE_{iso}$  e, por isso, é possível propor que é vantajoso estimar os parâmetros com  $MUE_{iso}$  ao invés de utilizar a abordagem MDE.

Os parâmetros estimados com  $MUE_{nao}$  apresentaram valores diferentes e intervalos de confiança mais largos, quando comparados aos parâmetros obtidos com  $MUE_{iso}$  e MDE. Uma explicação para estas diferenças são os perfis de temperatura dos experimentos utilizados na  $MUE_{nao}$ , que não foram delineados de forma ótima. Assim, as respostas desses experimentos têm menos informação para a estimativa dos parâmetros. Outro motivo que pode ter influenciado a incerteza dos parâmetros estimados foi a utilização de uma menor quantidade de dados e experimentos na  $MUE_{nao}$ , em comparação com a  $MUE_{iso}$  e com a MDE (quatro experimentos na  $MUE_{nao}$  e doze experimentos na  $MUE_{iso}$  e MDE). Entretanto, os parâmetros do DEO<sub>aumdim</sub> foram estimados também com quatro experimentos e a incerteza dos parâmetros foi menor, pois os quatro experimentos foram delineados de forma ótima.

Tabela 4.3 – Valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) e índices estatísticos ( $R^2$  e  $RMSE$ ) para as abordagens MDE, MUE e DEO.

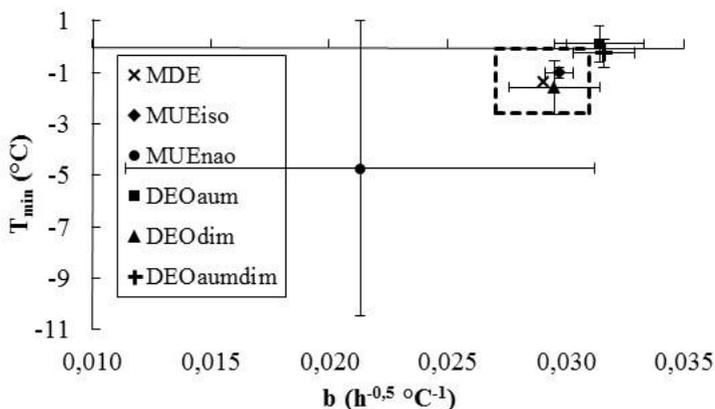
<b>Abordagem</b>	<b><math>b</math> (<math>h^{-0,5} \cdot ^\circ C^{-1}</math>)</b>	<b><math>T_{min}</math> (<math>^\circ C</math>)</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>RMSE</math></b>
MDE	0,0290 ( $\pm$ 0,0020)	-1,33 ( $\pm$ 1,26)	0,986	0,581
MUE <sub>iso</sub>	0,0297 ( $\pm$ 0,0006)	-1,00 ( $\pm$ 0,20)	0,986	0,575
MUE <sub>nao</sub>	0,0213 ( $\pm$ 0,0099)	-4,72 ( $\pm$ 5,76)	0,945	1,144
DEO <sub>4-8-12-16</sub>	0,0270 ( $\pm$ 0,0050)	-1,00 ( $\pm$ 1,66)	0,996	0,280
DEO <sub>12-16-20-25</sub>	0,0284 ( $\pm$ 0,0083)	-1,52 ( $\pm$ 4,84)	0,996	0,272
DEO <sub>aum</sub>	0,0314 ( $\pm$ 0,0019)	0,12 ( $\pm$ 0,71)	0,995	0,317
DEO <sub>16-12-8-4</sub>	0,0316 ( $\pm$ 0,0051)	-0,68 ( $\pm$ 2,03)	0,997	0,254
DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub>	0,0291 ( $\pm$ 0,0042)	-1,84 ( $\pm$ 2,88)	0,997	0,245
DEO <sub>dim</sub>	0,0295 ( $\pm$ 0,0019)	-1,57 ( $\pm$ 1,05)	0,999	0,259
DEO <sub>aumdim</sub>	0,0316 ( $\pm$ 0,0013)	-0,24 ( $\pm$ 0,55)	0,990	0,436

Ainda na Tabela 4.3 podemos observar que os intervalos de confiança dos parâmetros estimados com MDE, DEO<sub>aum</sub> e DEO<sub>dim</sub> foram muito próximos (em torno de  $0,0019 h^{-0,5} \text{ } ^\circ C^{-1}$  para o parâmetro  $b$  e  $1,0 \text{ } ^\circ C$  para o parâmetro  $T_{min}$ ). Portanto, com DEO<sub>aum</sub> e DEO<sub>dim</sub> foi possível estimar os parâmetros com mesmo grau de incerteza, porém com tempo e quantidade de dados experimentais muito menores em relação à MDE e, por isso, é possível afirmar que é vantajoso estimar os parâmetros com DEO ao invés de utilizar a abordagem MDE. Com DEO<sub>aumdim</sub> os índices estatísticos foram inferiores aos obtidos com DEO<sub>aum</sub> e DEO<sub>dim</sub>, porém os parâmetros foram obtidos com intervalos de confiança menores.

A Figura 4.19 apresenta a dispersão dos valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada para o crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo estimados com MDE, MUE<sub>iso</sub>, MUE<sub>nao</sub>, DEO<sub>aum</sub>, DEO<sub>dim</sub> e DEO<sub>aumdim</sub>, e os intervalos de confiança a 95% para a MDE. Na figura podemos observar que os valores dos parâmetros obtidos com MUE<sub>iso</sub> e DEO<sub>dim</sub> são muitos próximos dos valores obtidos com MDE, estando

dentro do intervalo de confiança a 95% obtido para a MDE. Os valores dos parâmetros estimados com DEO<sub>aum</sub> e DEO<sub>aumdim</sub> não são tão próximos dos valores estimados com a MDE, entretanto estão muito próximos do intervalo de confiança a 95% obtido para a MDE. Por sua vez, os valores dos parâmetros estimados com a MUE<sub>nao</sub> estão distantes dos valores estimados com a MDE.

Figura 4.19 – Dispersão dos valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada para o crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo estimados com as abordagens MDE, MUE<sub>iso</sub>, MUE<sub>nao</sub>, DEO<sub>aum</sub>, DEO<sub>dim</sub> e DEO<sub>aumdim</sub> (símbolos), intervalos de confiança a 95% para as diferentes abordagens a MDE (linhas tracejadas).



De uma forma geral, observando o conjunto de resultados obtidos em cada abordagem (quantidade de dados e tempo experimental, incerteza dos parâmetros e precisão das estimativas) é possível concluir que o DEO apresentou o melhor conjunto de resultados comparados a tradicional MDE e, portanto, seu uso pode ser indicado para estimativa de parâmetros em substituição a MDE.

A análise dos resultados obtidos nos diferentes experimentos com o DEO (DEO<sub>4-8-12-16</sub>, DEO<sub>12-16-20-25</sub> e DEO<sub>aum</sub>; DEO<sub>16-12-8-4</sub>, DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> e DEO<sub>dim</sub>) levam a conclusão de que os índices estatísticos ( $R^2$  e  $RMSE$ ) foram muito próximos para todos os casos ( $R^2$  próximos de 0,997 e  $RMSE$  próximos de 0,280), porém os valores dos parâmetros e, especialmente, os intervalos de confiança foram distintos. De forma específica, a incerteza do parâmetro  $T_{min}$  foi menor no perfil DEO<sub>4-8-12-16</sub> ( $\pm 1,66$ ) do que no DEO<sub>12-16-20-25</sub> ( $\pm 4,84$ ), pois a temperatura

mínima no DEO<sub>4-8-12-16</sub> (4 °C) foi mais próxima de  $T_{min}$  do que no DEO<sub>12-16-20-25</sub> (12 °C); e a incerteza do parâmetro  $b$  foi menor no perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> ( $\pm 0,0042$ ) do que no DEO<sub>16-12-8-4</sub> ( $\pm 0,0051$ ), pois a faixa de temperatura foi maior no DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> (25 a 4 °C) do que no DEO<sub>16-12-8-4</sub> (16 a 4 °C). Com relação aos intervalos de confiança dos parâmetros, os resultados já eram esperados e estão de acordo com as simulações preliminares. De forma geral, os intervalos de confiança menos largos foram obtidos para os parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  nas composições DEO<sub>aum</sub> e DEO<sub>dim</sub> do que no DEO<sub>4-8-12-16</sub>, DEO<sub>12-16-20-25</sub>, DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub> isoladamente. Isso ocorreu devido a utilização de dois experimentos na estimativa dos parâmetros, os quais ampliaram a faixa de temperatura analisada (no caso do DEO<sub>aum</sub>) e quantidade de dados experimentais obtidos nos delineamentos experimentais ótimos.

Uma análise adicional foi realizada com os dados experimentais obtidos em todos os experimentos em meio de cultivo (313 dados experimentais obtidos em 20 experimentos). Os modelos foram ajustados a todos os dados experimentais simultaneamente para verificar os valores e os intervalos de confiança dos parâmetros estimados. Nesta estimativa de parâmetros, os índices estatísticos do ajuste foram  $R^2 = 0,983$  e  $RMSE = 0,634$ , e os valores estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0301 (\pm 0,0005) \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -0,70 (\pm 0,17) \text{ } ^\circ\text{C}$ . Os parâmetros apresentaram menores intervalos de confiança e índices estatísticos piores em comparação com as estimativas anteriores (abordagens MDE, MUE e DEO). O objetivo desta análise adicional foi apenas de verificação dos resultados, pois, na prática, dificilmente haveria a estimativa de parâmetros com estas características.

Outra análise adicional foi realizada com os dados experimentais obtidos nos quatro perfis de temperatura delineados de forma ótima (DEO<sub>4-8-12-16</sub>, DEO<sub>12-16-20-25</sub>, DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>). Esta análise adicional consistiu primeiramente em separar o conjunto de dados experimentais em subconjuntos de dados obtidos em cada platô de temperatura de cada experimento não-isotérmico; ou seja, foram obtidos vários subconjuntos de dados isotérmicos a partir dos experimentos não-isotérmicos. Na sequência, estimou-se o coeficiente angular da reta ajustada aos dados do logaritmo natural da concentração microbiana em função do tempo (que, por definição, é o valor do parâmetro  $\mu_{max}$ ) para cada subconjunto de dados; ou seja, estimou-se o valor de  $\mu_{max}$  para cada platô de temperatura. Os valores do parâmetro  $\mu_{max}$  resultantes destas estimativas foram comparados com os valores de  $\mu_{max}$  estimados com

MDE (experimentos em condições isotérmicas com repetição) na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Valores do parâmetro  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) estimados com a MDE (com repetição) e estimados em cada platô de temperatura (subconjuntos) para os quatro perfis de temperatura delineados de forma ótima (DEO<sub>4-8-12-16</sub>, DEO<sub>12-16-20-25</sub>, DEO<sub>16-12-8-4</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4</sub>).

<b>Abordagem</b>	<b>4 °C</b>	<b>8 °C</b>	<b>12 °C</b>	<b>16 °C</b>	<b>20 °C</b>	<b>30 °C</b>
MDE	0,0177	0,0686	0,1598	0,2542	0,4126	0,8243
	0,0258	0,0574	0,1510	0,2720	0,4353	0,7378
DEO <sub>4-8-12-16</sub>	0,0204	0,0673	0,1812	*	-	-
DEO <sub>12-16-20-25</sub>	-	-	0,1615	0,2770	0,3864	*
DEO <sub>16-12-8-4</sub>	0,0191	0,0746	0,1730	0,2824	-	-
DEO <sub>25-20-16-12-8-4</sub>	*	0,0615	0,1629	0,2989	0,4151	

\*Dados experimentais foram obtidos nestas temperaturas, porém a curva do crescimento microbiano estava em desaceleração ou em fase estacionária, e por isso o parâmetro  $\mu_{max}$  não foi calculado.

De forma geral, é possível observar na Tabela 4.4 que os valores do parâmetro  $\mu_{max}$  estimados em cada platô de temperatura dos experimentos não-isotérmicos são, para a maioria dos casos, muito próximos dos valores estimados com os dados experimentais de uma curva completa em condições isotérmicas (MDE). Este fato contribui para ilustrar de forma simplificada que os perfis de temperatura delineados foram otimizados, pois o tempo e a quantidade de dados experimentais necessários em cada platô de temperatura são ótimos para a estimativa efetiva e eficiente dos parâmetros do modelo matemático (neste caso, de  $\mu_{max}$ ).

#### 4.6 VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS EM MEIO DE CULTIVO

Nos resultados anteriores da estimativa de parâmetros em meio de cultivo foi possível verificar que a MUE<sub>nao</sub> apresentou parâmetros com largos intervalos de confiança, além de índices estatísticos insatisfatórios ( $R^2$  e  $RMSE$ ) para o ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais. Portanto, os parâmetros estimados pela MUE<sub>nao</sub> já podem ser rejeitados antes mesmo da etapa de validação.

É recomendável que os dados experimentais utilizados na validação dos parâmetros sejam obtidos em condições experimentais baseadas em condições não-isotérmicas, possibilitando avaliar a capacidade preditiva do modelo matemático para utilização posterior. Os dados experimentais utilizados na estimativa dos parâmetros com a  $MUE_{nao}$  (perfis  $NOT_{5-11(24h)}$ ,  $NOT_{5-11(12h)}$ ,  $NOT_{5-8(12h)}$  e  $NOT_{3-10(12h)}$ ) apresentam esta característica e são inéditos para as abordagens MDE,  $MUE_{iso}$  e DEO. Além disso, a validação dos parâmetros obtidos nas diferentes abordagens, baseada em um mesmo conjunto de dados experimentais, permite uma análise comparativa das respectivas capacidades preditivas dos modelos. Diante disto, a validação dos parâmetros obtidos nas abordagens MDE,  $MUE_{iso}$ ,  $DEO_{aum}$ ,  $DEO_{dim}$  e  $DEO_{aumdim}$  foi realizada utilizando os dados experimentais em cinco condições não-isotérmicas ( $NOT_{5-11(24h)}$ ,  $NOT_{5-11(12h)}$ ,  $NOT_{5-8(12h)}$ ,  $NOT_{3-10(12h)}$  e  $DEO_{12-8-4-8-12}$ ).

Os resultados dos índices estatísticos *RMSE*, *fator tendência* e *fator exatidão* obtidos na validação dos parâmetros estimados com MDE,  $MUE_{iso}$  e DEO foram calculados para as cinco condições experimentais e podem ser observados na Tabela 4.5.

De forma geral, os modelos matemáticos com os parâmetros obtidos nas diferentes abordagens geraram previsões satisfatórias do crescimento microbiano, como é possível verificar através dos valores do *fator exatidão* e do *RMSE*, sendo que a pior predição resultou no *fator exatidão* = 1,085 e *RMSE* = 1,694. A grande maioria dos modelos falhou de forma segura (os modelos superestimaram o crescimento microbiano), como é possível verificar através dos valores do *fator tendência*, sendo que as poucas falhas perigosas (subestimações) são observadas com valores do *fator tendência* próximo de um.

Os valores dos índices estatísticos *RMSE*, *fator tendência* e *fator exatidão* foram menores utilizando os parâmetros estimados com a  $MUE_{iso}$  em relação aos parâmetros estimados com a MDE, como pode ser visto na Tabela 4.5. Isso mostra que os parâmetros estimados com a  $MUE_{iso}$  são mais confiáveis e possuem maior validade em relação aos parâmetros estimados com a MDE. Estes resultados são mais uma evidência clara de que, quando temos o mesmo conjunto de dados experimentais, devemos optar por estimar os parâmetros dos modelos matemáticos em uma etapa ( $MUE_{iso}$ ) ao invés de duas etapas (MDE).

Tabela 4.5 – Índices estatísticos *RMSE*, *fator tendência* e *fator exatidão* obtidos na validação dos parâmetros estimados com MDE,  $MUE_{iso}$  e DEO para os perfis  $NOT_{5-11(24h)}$ ,  $NOT_{5-11(12h)}$ ,  $NOT_{5-8(12h)}$ ,  $NOT_{3-10(12h)}$  e  $DEO_{12-8-4-8-12}$ .

Perfil	Abordagem	<i>RMSE</i>	<i>Fator tendência</i>	<i>Fator exatidão</i>
$NOT_{5-11(24h)}$	MDE	1,116	1,033	1,062
	$MUE_{iso}$	1,102	1,029	1,060
	$DEO_{aum}$	1,242	1,000	1,053
	$DEO_{dim}$	1,250	1,049	1,069
	$DEO_{aumdim}$	1,100	1,020	1,057
$NOT_{5-11(12h)}$	MDE	0,915	1,028	1,033
	$MUE_{iso}$	0,827	1,023	1,030
	$DEO_{aum}$	0,627	0,987	1,029
	$DEO_{dim}$	1,301	1,048	1,052
	$DEO_{aumdim}$	0,677	1,012	1,028
$NOT_{5-8(12h)}$	MDE	1,518	1,019	1,073
	$MUE_{iso}$	1,520	1,008	1,070
	$DEO_{aum}$	2,043	0,941	1,070
	$DEO_{dim}$	1,653	1,050	1,083
	$DEO_{aumdim}$	1,627	0,982	1,065
$NOT_{3-10(12h)}$	MDE	1,321	1,065	1,066
	$MUE_{iso}$	1,214	1,060	1,061
	$DEO_{aum}$	0,553	1,024	1,031
	$DEO_{dim}$	1,694	1,084	1,085
	$DEO_{aumdim}$	0,991	1,048	1,050
$DEO_{12-8-4-8-12}$	MDE	0,295	1,011	1,018
	$MUE_{iso}$	0,269	1,004	1,016
	$DEO_{aum}$	0,994	0,959	1,053
	$DEO_{dim}$	0,711	1,038	1,042
	$DEO_{aumdim}$	0,467	0,990	1,027

Na Tabela 4.5 é possível observar que na maioria dos casos os índices estatísticos foram melhores utilizando os parâmetros estimados com o  $DEO_{aumdim}$  em relação aos parâmetros estimados com a MDE. Nessa comparação direta, os valores do *RMSE* foram menores com o  $DEO_{aumdim}$  em três perfis ( $NOT_{5-11(24h)}$ ,  $NOT_{5-11(12h)}$  e  $NOT_{3-10(12h)}$ ), os valores do *fator exatidão* foram menores em com o  $DEO_{aumdim}$  em quatro perfis ( $NOT_{5-11(24h)}$ ,  $NOT_{5-11(12h)}$ ,  $NOT_{5-8(12h)}$  e  $NOT_{3-10(12h)}$ ), e os valores do *fator tendência* foram mais próximos de um com o  $DEO_{aumdim}$  em todos os casos (inclusive nos perfis  $NOT_{5-8(12h)}$  e  $DEO_{12-8-4-8-12}$ , para os

quais é possível observar que há subestimação do crescimento). Da mesma forma, podemos afirmar que os parâmetros estimados com o  $DEO_{aumdim}$  são mais confiáveis e possuem maior validade em relação aos parâmetros estimados com MDE. Portanto, esta é mais uma vantagem do DEO em relação ao MDE, além das diversas vantagens já citadas anteriormente (em relação a incerteza dos parâmetros estimados, da quantidade de dados experimentais necessários e do tempo experimental).

Os dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo para os perfis  $NOT_{5-11(24h)}$ ,  $NOT_{5-11(12h)}$ ,  $NOT_{5-8(12h)}$ ,  $NOT_{3-10(12h)}$  e  $DEO_{12-8-4-8-12}$  e as previsões do crescimento pelos modelos matemáticos com parâmetros estimados com o  $OED_{aumdim}$  e com a MDE são apresentados na Figura 4.20, Figura 4.21, Figura 4.22, Figura 4.23 e Figura 4.24, respectivamente.

Figura 4.20 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo para o perfil  $NOT_{5-11(24h)}$  (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e previsão do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela  $DEO_{aumdim}$  (linha contínua) e MDE (linha tracejada).

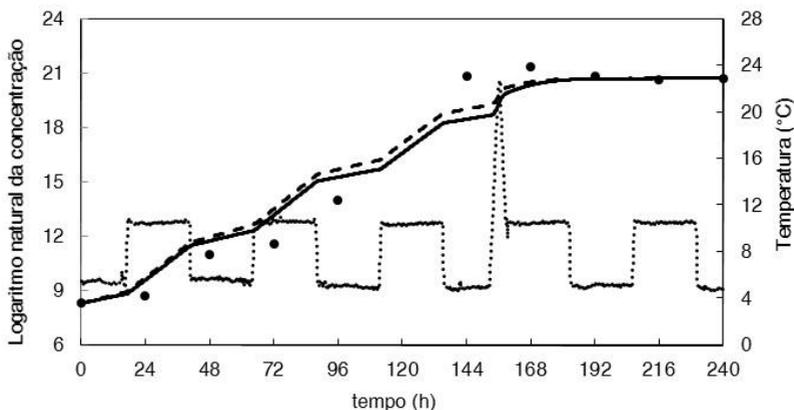


Figura 4.21 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo para o perfil NOT<sub>5-11(12h)</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO<sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).

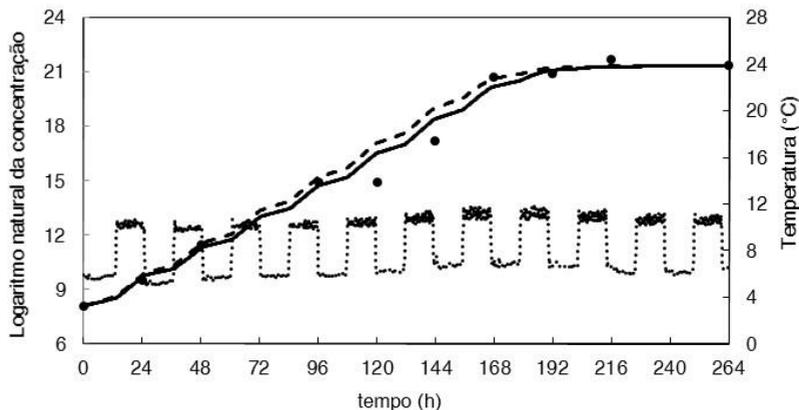


Figura 4.22 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo para o perfil NOT<sub>5-8(12h)</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO<sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).

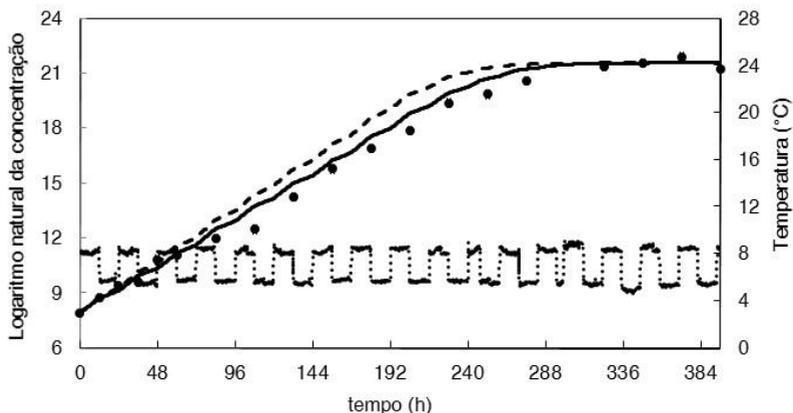


Figura 4.23 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo para o perfil NOT<sub>3-10(12h)</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO<sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).

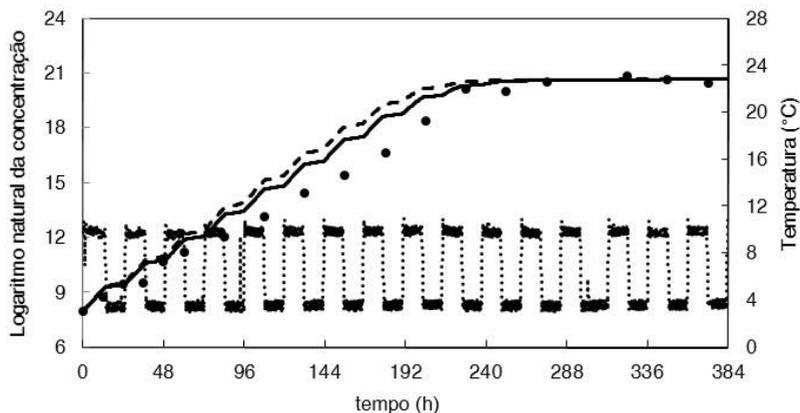
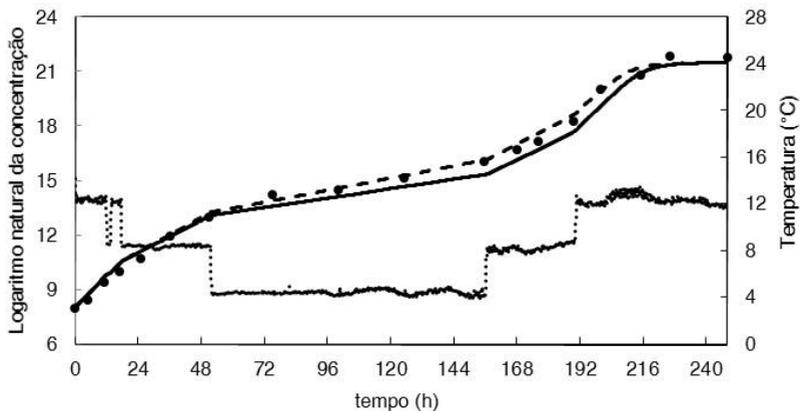


Figura 4.24 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo para o perfil DEO<sub>12-8-4-8-12</sub> (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e predição do crescimento pelos modelos matemáticos com os parâmetros estimados pela DEO<sub>aumdim</sub> (linha contínua) e MDE (linha tracejada).

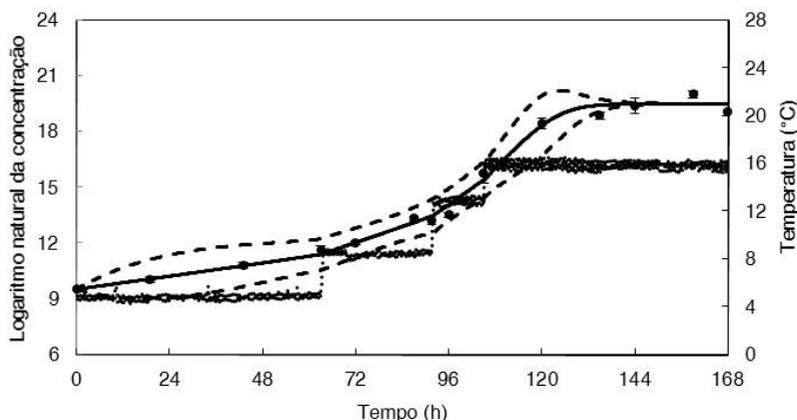


#### 4.7 PARÂMETROS ESTIMADOS COM DEO EM PRESUNTO

Os experimentos delineados de forma ótima para o crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo foram realizados também em presunto (DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>, DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub>, DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub>). Como não haviam dados experimentais prévios do crescimento de *W. viridescens* em presunto em condições isotérmicas, o valor do parâmetro  $h_0$  (valor inicial do estado fisiológico das células) foi estimado com os dados experimentais em condições não-isotérmicas, juntamente com os parâmetros  $b$  e  $T_{min}$ .

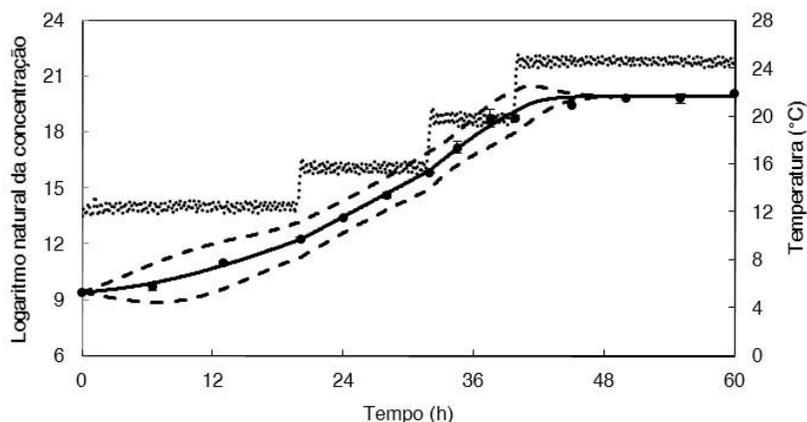
Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>, o modelo matemático se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,993$  e  $RMSE = 0,312$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0266 (\pm 0,0153) h^{0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ,  $T_{min} = -1,71 (\pm 7,71) \text{ } ^\circ\text{C}$  e  $h_0 = 0,001 (\pm 2,963)$ . Na Figura 4.25 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>, a temperatura experimental (linha pontilhada) e os intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).

Figura 4.25 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).



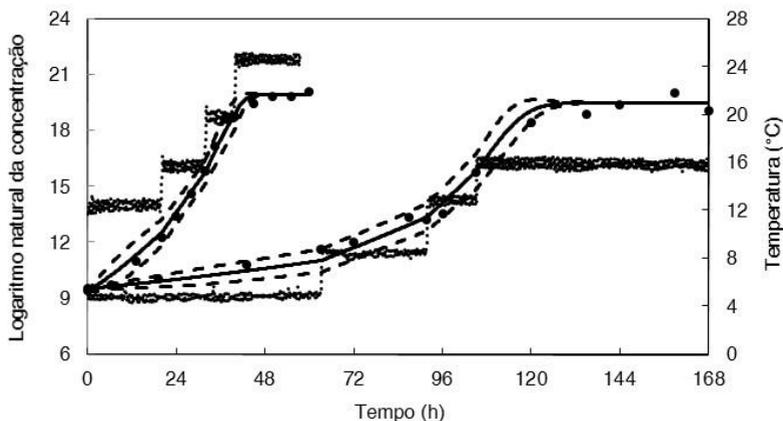
Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, o modelo matemático também se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,997$  e  $RMSE = 0,198$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0301 (\pm 0,0244) \text{ h}^{0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ,  $T_{min} = -3,02 (\pm 15,68) \text{ } ^\circ\text{C}$  e  $h_0 = 1,528 (\pm 1,926)$ . Na Figura 4.26 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, a temperatura experimental e os intervalos de predição do modelo matemático a 95%.

Figura 4.26 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).



O modelo matemático foi, então, ajustado simultaneamente aos dados experimentais obtidos nos perfis DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub> e DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, assim como foi realizado para os experimentos em meio de cultivo, compondo neste caso o DEO<sub>aum-pres</sub>. O modelo matemático mais uma vez se ajustou bem aos dados experimentais, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,991$  e  $RMSE = 0,358$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0327 (\pm 0,0025) \text{ h}^{0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ,  $T_{min} = -0,47 (\pm 0,98) \text{ } ^\circ\text{C}$  e  $h_0 = 0,433 (\pm 0,855)$ . O ajuste simultâneo do modelo matemático aos dados experimentais dos perfis DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub> e DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub> pode ser visto na Figura 4.27.

Figura 4.27 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* em presunto para os perfis DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub> e DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, perfis de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).



Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub>, o modelo matemático se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,998$  e  $RMSE = 0,162$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0438 (\pm 0,0117) \text{ h}^{0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ,  $T_{min} = 1,39 (\pm 2,63) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $h_0 = 1,255 (\pm 1,039)$ . Na Figura 4.28 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub>, a temperatura experimental e os intervalos de predição do modelo matemático a 95%.

Na estimativa de parâmetros para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub>, o modelo matemático também se ajustou bem aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens*, sendo que os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,998$  e  $RMSE = 0,191$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0509 (\pm 0,0170) \text{ h}^{0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ,  $T_{min} = 4,49 (\pm 4,33) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $h_0 = 2,918 (\pm 1,537)$ . Na Figura 4.29 são apresentados o ajuste do modelo aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub>, a temperatura experimental e os intervalos de predição do modelo matemático a 95%.

Figura 4.28 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).

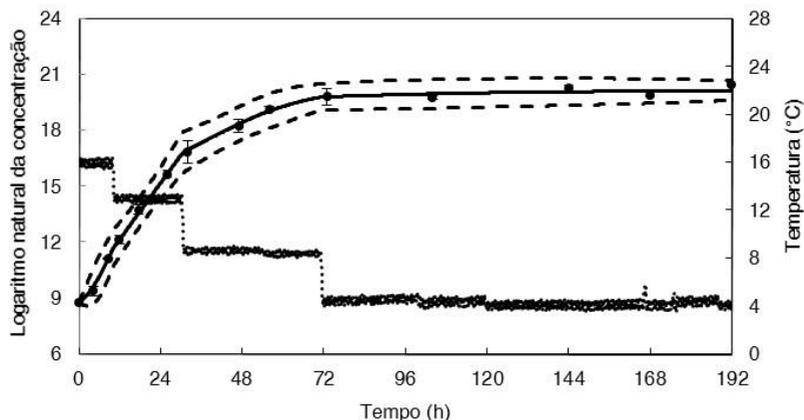
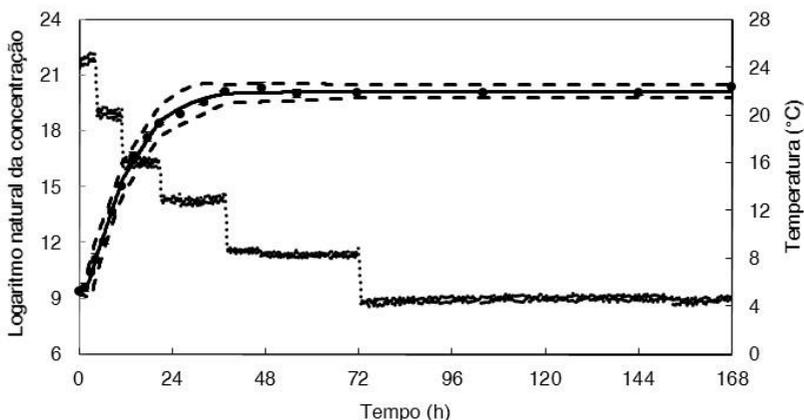


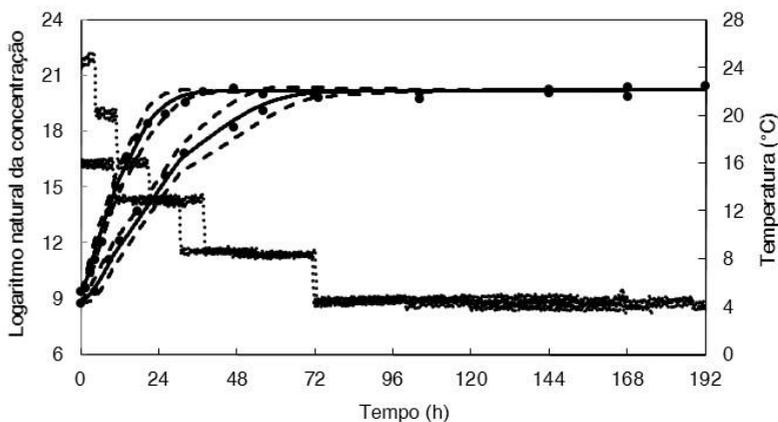
Figura 4.29 – Ajuste do modelo matemático (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* em presunto para o perfil DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub>, perfil de temperatura experimental (linha pontilhada) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linha tracejada).



O modelo matemático foi, então, ajustado simultaneamente aos dados experimentais obtidos em presunto nos perfis DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub>, compondo o DEO<sub>dim-pres</sub>. O modelo matemático mais uma vez se ajustou bem aos dados experimentais, sendo os índices

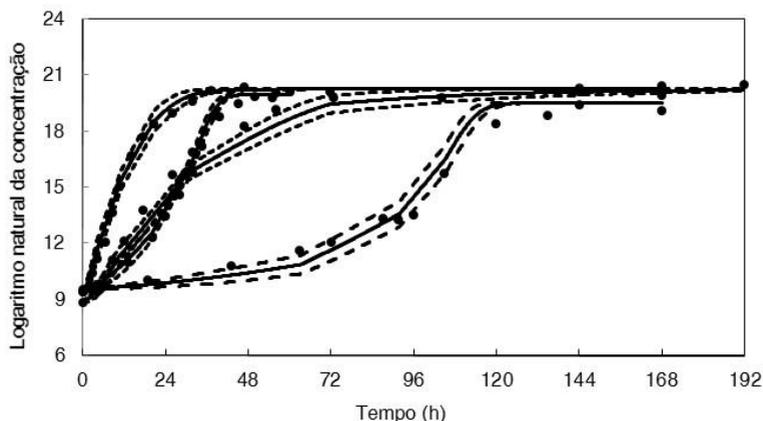
estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,995$  e  $RMSE = 0,296$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0310 (\pm 0,0038) \text{ h}^{0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ,  $T_{min} = -3,37 (\pm 1,98) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $h_0 = 1,109 (\pm 0,681)$ . O ajuste simultâneo do modelo matemático aos dados experimentais dos perfis DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub> pode ser visto na Figura 4.30.

Figura 4.30 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* em presunto para os perfis DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub>, perfis de temperatura experimental (linhas pontilhadas) e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).



O DEO<sub>aumdim-pres</sub> consistiu no ajuste simultâneo dos modelos matemáticos aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em presunto obtidos nos quatro perfis de temperatura (DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>, DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub>). Nesta estimativa de parâmetros, os índices estatísticos dos ajustes foram  $R^2 = 0,986$  e  $RMSE = 0,470$ . Os valores dos parâmetros estimados através do ajuste ( $\pm$  intervalos de confiança de 95%) foram  $b = 0,0354 (\pm 0,0019) \text{ h}^{0,5} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ,  $T_{min} = -0,57 (\pm 0,61) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $h_0 = 1,134 (\pm 0,588)$ . O ajuste do modelo matemático aos dados experimentais dos perfis DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>, DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub> pode ser visto na Figura 4.31.

Figura 4.31 – Ajuste do modelo matemático (linhas contínuas) simultaneamente aos dados experimentais (símbolos) do crescimento de *W. viridescens* em presunto para os perfis DEO<sub>4-8-12-16-pres</sub>, DEO<sub>12-16-20-25-pres</sub>, DEO<sub>16-12-8-4-pres</sub> e DEO<sub>25-20-16-12-8-4-pres</sub> e intervalos de predição do modelo matemático a 95% (linhas tracejadas).



#### 4.8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM PRESUNTO E VALIDAÇÃO DOS PARÂMETROS ESTIMADOS

A O ajuste da composição DEO<sub>aumdim-pres</sub> resultou em índices estatísticos inferiores a todos os demais, porém em uma análise pontual é possível considerar que os índices estatísticos são satisfatórios. Por outro lado, os parâmetros estimados com DEO<sub>aumdim-pres</sub> apresentaram os menores intervalos de confiança, indicando que os parâmetros estimados com DEO<sub>aumdim-pres</sub> são os mais confiáveis.

apresenta de forma comparativa os valores dos parâmetros  $h_0$ ,  $b$  e  $T_{min}$  ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) estimados com os diferentes perfis ótimos, e os índices estatísticos ( $R^2$  e  $RMSE$ ) dos ajustes dos modelos matemáticos para o crescimento de *W. viridescens* em presunto.

Na O ajuste da composição DEO<sub>aumdim-pres</sub> resultou em índices estatísticos inferiores a todos os demais, porém em uma análise pontual é possível considerar que os índices estatísticos são satisfatórios. Por outro lado, os parâmetros estimados com DEO<sub>aumdim-pres</sub> apresentaram os menores intervalos de confiança, indicando que os parâmetros estimados com DEO<sub>aumdim-pres</sub> são os mais confiáveis.

é possível observar pelos índices estatísticos ( $R^2$  e  $RMSE$ ) que os modelos matemáticos se ajustaram bem aos dados experimentais para

todos os casos. Em uma análise comparativa entre os resultados, é possível verificar que valores maiores de  $R^2$  e menores de  $RMSE$  foram observados para os perfis compostos de apenas um experimento ( $DEO_{4-8-12-16-pres}$ ,  $DEO_{12-16-20-25-pres}$ ,  $DEO_{16-12-8-4-pres}$  e  $DEO_{25-20-16-12-8-4-pres}$ ) em relação aos perfis compostos de dois ( $DEO_{aum-pres}$  e  $DEO_{dim-pres}$ ) ou quatro ( $DEO_{aumdim-pres}$ ) experimentos. Os valores menores de  $R^2$  e maiores de  $RMSE$  nas composições  $DEO_{aum-pres}$ ,  $DEO_{dim-pres}$  e  $DEO_{aumdim-pres}$  podem ser associados com o aumento da quantidade de experimentos, sendo que os parâmetros estimados previamente nas composições com um experimento foram diferentes. Por outro lado, os valores dos parâmetros  $h_0$ ,  $b$  e  $T_{min}$  convergiram para os valores ótimos a partir das composições com um experimento em direção às composições com dois experimentos, e depois em direção às composições com quatro experimentos. Os intervalos de confiança dos parâmetros estimados diminuíram com o aumento da quantidade de experimentos das composições (como pode ser visto, por exemplo, na composição  $DEO_{aumdim-pres}$ ), apresentando um grande ganho de informação na estimativa de parâmetros.

Tabela 4.6 – Valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) estimados com os diferentes perfis ótimos e índices estatísticos ( $R^2$  e  $RMSE$ ) dos ajustes dos modelos matemáticos para o crescimento de *W. viridescens* em presunto.

Composição	$h_0$	$b (h^{-0,5} \cdot C^{-1})$	$T_{min} (^\circ C)$	$R^2$	$RMSE$
$DEO_{4-8-12-16-pres}$	0,001 ( $\pm 2,963$ )	0,0266 ( $\pm 0,0153$ )	-1,71 ( $\pm 7,71$ )	0,993	0,312
$DEO_{12-16-20-25-pres}$	1,528 ( $\pm 1,926$ )	0,0301 ( $\pm 0,0244$ )	-3,02 ( $\pm 15,68$ )	0,997	0,198
$DEO_{aum-pres}$	0,433 ( $\pm 0,855$ )	0,0327 ( $\pm 0,0025$ )	-0,47 ( $\pm 0,98$ )	0,991	0,358
$DEO_{16-12-8-4-pres}$	1,255 ( $\pm 1,039$ )	0,0438 ( $\pm 0,0117$ )	1,39 ( $\pm 2,63$ )	0,998	0,162
$DEO_{25-20-16-12-8-4-pres}$	2,918 ( $\pm 1,537$ )	0,0509 ( $\pm 0,0170$ )	4,49 ( $\pm 4,33$ )	0,998	0,191
$DEO_{dim-pres}$	1,109 ( $\pm 0,681$ )	0,0310 ( $\pm 0,0038$ )	-3,37 ( $\pm 1,98$ )	0,995	0,296
$DEO_{aumdim-pres}$	1,134 ( $\pm 0,588$ )	0,0354 ( $\pm 0,0019$ )	-0,57 ( $\pm 0,61$ )	0,986	0,470

O ajuste da composição  $DEO_{aumdim-pres}$  resultou em índices estatísticos inferiores a todos os demais, porém em uma análise pontual é possível considerar que os índices estatísticos são satisfatórios. Por outro lado, os parâmetros estimados com  $DEO_{aumdim-pres}$  apresentaram os menores intervalos de confiança, indicando que os parâmetros estimados com  $DEO_{aumdim-pres}$  são os mais confiáveis.

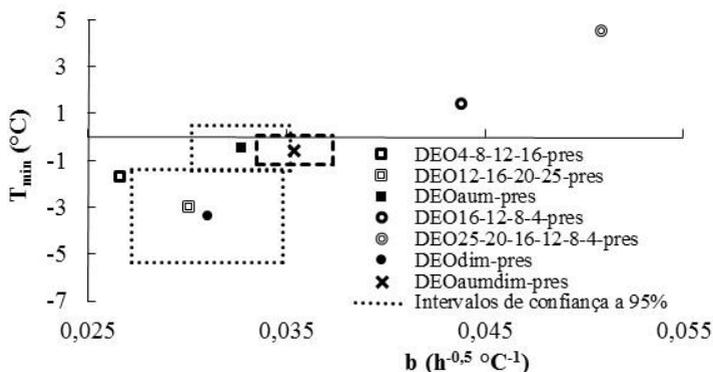
Os parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  estimados simultaneamente com dois experimentos ( $DEO_{aum-pres}$  e  $DEO_{dim-pres}$ ) apresentaram menor incerteza em relação aos parâmetros estimados em cada experimento ( $DEO_{4-8-12-16-pres}$ ,  $DEO_{12-16-20-25-pres}$ ,  $DEO_{16-12-8-4-pres}$  e  $DEO_{25-20-16-12-8-4-pres}$ ). Da mesma forma, os parâmetros estimados simultaneamente com quatro experimentos ( $DEO_{aumdim-pres}$ ) apresentaram a menor incerteza entre todos os casos. Em relação aos valores estimados, os parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  estimados com um experimento apresentaram valores diferentes entre eles, e diferentes de  $b$  e  $T_{min}$  estimados nas composições de dois experimentos. Por sua vez, os parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  estimados nas composições de dois experimentos apresentaram valores semelhantes aos valores de  $b$  e  $T_{min}$  estimados nas composições de quatro experimentos. Assim, o aumento da quantidade de experimentos contribuiu para a convergência dos valores de  $b$  e  $T_{min}$  em direção aos valores ótimos, e os perfis com apenas um experimento foram insuficientes para estimar os parâmetros com baixa incerteza.

Os parâmetros estimados com maior incerteza entre todos os casos foram obtidos no perfil  $DEO_{12-16-20-25-pres}$ . Este resultado já era esperado, especialmente para  $T_{min}$ , conforme apresentado nos resultados das simulações preliminares, pois a menor temperatura do experimento (12 °C) está distante de  $T_{min}$ . Nos outros experimentos, a menor temperatura foi de 4 °C para todos os casos.

A Figura 4.32 apresenta a dispersão dos valores dos parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  do modelo da Raiz Quadrada para o crescimento de *W. viridescens* em presunto, estimados com os diferentes perfis e composições. Na figura é possível verificar que os valores dos parâmetros estimados com aumento de temperatura ( $DEO_{4-8-12-16-pres}$  e  $DEO_{12-16-20-25-pres}$ ) são menores do que os valores dos parâmetros estimados com diminuição de temperatura ( $DEO_{16-12-8-4-pres}$  e  $DEO_{25-20-16-12-8-4-pres}$ ). De forma geral, é possível verificar também que os parâmetros estimados com um experimento ( $DEO_{4-8-12-16-pres}$ ,  $DEO_{12-16-20-25-pres}$ ,  $DEO_{16-12-8-4-pres}$  e  $DEO_{25-20-16-12-8-4-pres}$ ) estão relativamente distantes entre si, os parâmetros estimados com dois experimentos ( $DEO_{aum-pres}$  e  $DEO_{dim-pres}$ ) estão mais próximos entre si, e os parâmetros estimados com quatro experimentos

( $DEO_{\text{aumdim-pres}}$ ) estão em um ponto que é praticamente o centro geométrico de todos os outros parâmetros estimados. Esta sequência de resultados indica que houve a convergência em direção aos valores estimados com  $DEO_{\text{aumdim-pres}}$  à medida em que mais experimentos foram considerados na estimativa dos parâmetros. Os intervalos de confiança dos parâmetros foram gradualmente menos largos com o aumento da quantidade de experimentos considerados no ajuste.

Figura 4.32 – Dispersão dos valores dos parâmetros do modelo da Raiz Quadrada para o crescimento de *W. viridescens* em presunto estimados com  $DEO_{4-8-12-16-pres}$ ,  $DEO_{12-16-20-25-pres}$ ,  $DEO_{16-12-8-4-pres}$ ,  $DEO_{25-20-16-12-8-4-pres}$ ,  $DEO_{\text{aum-pres}}$ ,  $DEO_{\text{dim-pres}}$  e  $DEO_{\text{aumdim-pres}}$  (símbolos), intervalos de confiança a 95% para os parâmetros com  $DEO_{\text{aum-pres}}$  e  $DEO_{\text{dim-pres}}$  (linhas pontilhadas) e intervalos de confiança a 95% para os parâmetros com  $DEO_{\text{aumdim-pres}}$  (linhas tracejadas).



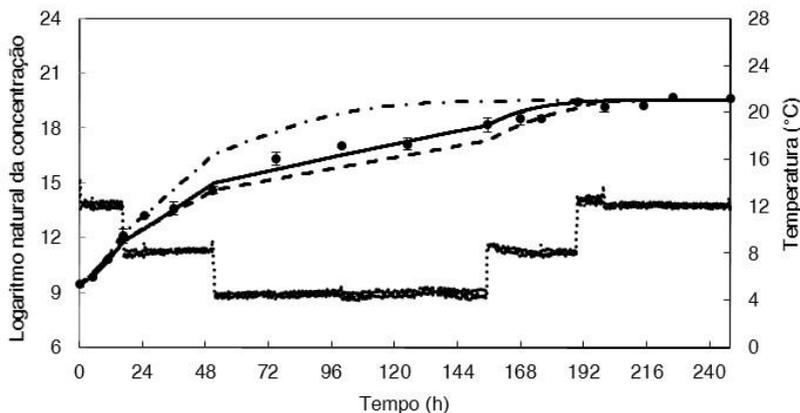
Os valores estimados para o parâmetro  $h_0$  foram 0,001, 1,528, 1,255 e 2,918 para os perfis  $DEO_{4-8-12-16-pres}$ ,  $DEO_{12-16-20-25-pres}$ ,  $DEO_{16-12-8-4-pres}$  e  $DEO_{25-20-16-12-8-4-pres}$ , respectivamente. O parâmetro  $h_0$  está relacionado com o estado fisiológico inicial das células (e com a duração da fase de adaptação), sendo que conceitualmente seu valor é constante e independente da temperatura inicial do experimento quando o inóculo tem o mesmo histórico (Baranyi e Roberts, 1994). Entretanto, podemos observar que os valores estimados para o parâmetro  $h_0$  são diferentes nos diferentes experimentos, sendo que um valor menor de  $h_0$  foi estimado no experimento que iniciou a 4 °C ( $h_0 = 0.001$ ) e um valor maior de  $h_0$  foi estimado no experimento que iniciou a 25 °C ( $h_0 = 2.918$ ). Um valor médio para o parâmetro  $h_0$  ( $h_{0\text{-médio}}$ ) pode ser calculado através da média aritmética dos valores de  $h_0$  estimados nos diferentes

experimentos (Baranyi e Roberts, 1994). O valor de  $h_{0\text{-médio}}$  calculado a partir dos valores de  $h_0$  dos quatro experimentos foi 1,426 (desvio padrão = 1,197), indicando que o parâmetro  $h_0$  apresenta maior incerteza do que os outros parâmetros estimados. O valor do parâmetro  $h_0$  estimado na composição DEO<sub>aumdim-pres</sub> foi 1,134 ( $\pm 0,588$ ) (intervalo de confiança a 95%). Assim, esses resultados indicam que a estimativa exata do valor do parâmetro  $h_0$  é afetada pela temperatura dos experimentos, sendo que o valor do  $h_{0\text{-médio}}$  apresentou um alto desvio padrão e o  $h_0$  estimado na composição DEO<sub>aumdim-pres</sub> apresentou uma incerteza moderada.

A elevada incerteza na estimativa do parâmetro  $h_0$  havia sido verificada nos experimentos isotérmicos desta tese (item 4.2) e tem sido reportada também em outros trabalhos na literatura para diferentes espécies de micro-organismos. Xanthiakos et al. (2006) avaliou o crescimento de *Listeria monocytogenes* em leite pasteurizado e estimou maiores valores de  $h_0$  em temperaturas menores ( $h_{0\text{-médio}} = 4,37$  e  $4,50$  a  $4^\circ\text{C}$  e  $1,5^\circ\text{C}$ , respectivamente; e  $h_{0\text{-médio}} = 1,34$  entre  $8^\circ\text{C}$  e  $16^\circ\text{C}$ ). Zhou et al. (2008) avaliou o crescimento de *Streptococcus iniae* em Tilapia e verificou que valores estimados de  $h_0$  variaram de 3 até 6 (sendo  $h_{0\text{-médio}} = 4,3$ ); Juneja et al. (2007) avaliou o crescimento de *Salmonella* em frango e verificou que os valores estimados de  $h_0$  variaram entre 1 e 2,3 (sendo  $h_{0\text{-médio}} = 1,75$ ); e Gospavic et al. (2008) avaliou o crescimento de *Pseudomonas* spp. em carne de aves e verificou que os valores estimados de  $h_0$  variaram de 0,2 até 2,7 (sendo  $h_{0\text{-médio}} = 1,0$ ).

A predição do crescimento de *W. viridescens* em presunto, para o perfil DEO<sub>12-8-4-8-12-pres</sub>, com os parâmetros estimados com DEO<sub>aum-pres</sub>, DEO<sub>dim-pres</sub> e DEO<sub>aumdim-pres</sub>, resultaram nos seguintes índices estatísticos: *fator exatidão* = 1,025, 1,044 e 1,017; *fator tendência* = 0,984, 1,043 e 0,997; e *RMSE* = 0,514, 1,024 e 0,344; respectivamente. As predições podem ser verificadas na Figura 4.33.

Figura 4.33 – Dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em presunto (círculos), perfil de temperatura experimental (linha pontilhada), previsões do crescimento com DEO<sub>aum-pres</sub> (linha tracejada), DEO<sub>dim-pres</sub> (linha de traços e pontos) e DEO<sub>aumdim-pres</sub> (linha contínua) para o perfil DEO<sub>12-8-4-8-12</sub>.



O crescimento de *W. viridescens* em presunto predito com os parâmetros estimados no DEO<sub>aum-pres</sub> e DEO<sub>dim-pres</sub> foi subestimado (*fator tendência* < 1) e superestimado (*fator tendência* > 1), respectivamente, em relação ao crescimento observado no experimento DEO<sub>12-8-4-8-12</sub>. Por sua vez, o crescimento predito com os parâmetros estimados no DEO<sub>aumdim-pres</sub> foi muito próximo ao crescimento observado no experimento DEO<sub>12-8-4-8-12</sub>, em que o *fator tendência* foi próximo de um e menores valores de *RMSE* e *fator exatidão* foram observados em comparação com as outras duas previsões. Os parâmetros estimados com DEO<sub>aumdim-pres</sub> podem ser válidos na faixa de 4 a 25 °C (faixa de temperatura na estimativa de parâmetros), sendo que a previsão realizada na faixa de 4 a 12 °C e comparada aos dados experimentais obtidos garantem que o modelo matemático apresenta uma boa capacidade preditiva.



## 5 CONCLUSÕES

Os parâmetros do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo, estimados com o Delineamento Experimental Ótimo (DEO), demandaram o menor tempo e quantidade de dados experimentais em comparação com as abordagens Modelagem em Duas Etapas (MDE), Modelagem em Uma Etapa com dados isotérmicos ( $MUE_{iso}$ ) e Modelagem em Uma Etapa com dados não-isotérmicos ( $MUE_{nao}$ ), sendo que apenas 17% do tempo e 31% dos dados experimentais foram necessários para estimar os parâmetros com o DEO em comparação com a MDE e  $MUE_{iso}$ .

Os parâmetros estimados com a  $MUE_{iso}$  apresentaram a menor incerteza entre todas as abordagens. Portanto, a  $MUE_{iso}$  apresenta vantagens em comparação com a MDE, pois os mesmos dados experimentais são utilizados em ambas MDE e  $MUE_{iso}$ . Entretanto, foi possível obter parâmetros com menor incerteza com a  $MUE_{iso}$ . Os parâmetros estimados com o DEO também apresentaram baixa incerteza, mas maior em comparação com a  $MUE_{iso}$ . Por sua vez, os parâmetros estimados com a  $MUE_{nao}$  apresentaram grande incerteza e os índices estatísticos dos ajustes foram insatisfatórios, levando à conclusão de que a  $MUE_{nao}$  foi a abordagem menos apropriada para a estimativa dos parâmetros.

Nos testes de validação em meio de cultivo, os modelos matemáticos geraram previsões satisfatórias do crescimento microbiano com os parâmetros estimados com a MDE, a  $MUE_{iso}$  e o DEO, sendo que, em geral, as melhores previsões foram obtidas com os parâmetros estimados com o DEO.

O DEO também pode ser utilizado com sucesso para a estimativa dos parâmetros do crescimento de *W. viridescens* em presunto. Os modelos representaram bem os dados experimentais do crescimento do micro-organismo no presunto e os parâmetros estimados apresentaram baixa incerteza, exceto o parâmetro inicial do estado fisiológico das células que apresentou uma incerteza maior (porém esperada). A validação dos parâmetros, realizada para um experimento não-isotérmico, mostrou que a previsão do modelo matemático foi satisfatória.

Considerando todos os resultados obtidos nos experimentos em meio de cultivo, foi possível concluir que o DEO foi a abordagem mais vantajosa para a estimativa dos parâmetros do crescimento de *W. viridescens*.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Esta tese de doutorado trouxe vários resultados e conclusões importantes sobre a estimativa dos parâmetros do crescimento de micro-organismos com diferentes abordagens. A partir deste ponto é possível sugerir que os trabalhos futuros continuem a explorar o Delineamento Experimental Ótimo e investiguem alguns outros aspectos que podem ser considerados importantes:

- estimar os parâmetros do crescimento de outras espécies de micro-organismos (em especial espécies deteriorantes) em diferentes tipos de alimentos aplicando o DEO;
- utilizar o DEO para analisar o crescimento de micro-organismos que apresentam longos tempos de adaptação ao alimento, tendo em vista a importância deste parâmetro para a qualidade dos alimentos;
- aplicar o DEO para estimar os parâmetros do crescimento de micro-organismos em alimentos, analisando a variação de outros fatores, como o pH, a atividade de água e outros compostos de interesse.

## 6 REFERÊNCIAS

ABADIE, J.; CARPENTIER, J. Generalization of the Wolfe Reduced Gradient Method to the Case of Nonlinear Constraints. Em: **Optimization**. Ed. FLETCHER, R. Academic Press, New York: 1969.

ASPREY, S. P.; MACCHIETTO, S. Designing robust optimal dynamic experiments. **Journal of Process Control**, v. 12, p. 545-556, 2002.

ATKINSON, A. C. The Usefulness of Optimum Experimental Designs. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B**, v. 58, 59-76, 1996.

BALSA-CANTO, E.; ALONSO, A. A.; BANGA, J. R. Computing optimal dynamic experiments for model calibration in predictive microbiology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 31, p. 186-206, 2008.

BALSA-CANTO, E.; BANGA, J. R. AMIGO, a toolbox for Advanced Model Identification in systems biology using Global Optimization. **Bioinformatics**, 2011. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr370.

BALSA-CANTO, E.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, M.; BANGA, J. R. Optimal design of dynamic experiments for improved estimation of kinetic parameters of thermal degradation. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p 178-188, 2007.

BARANYI, J. et al. 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.

BARANYI, J.; TAMPLIN, M. ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. **Journal of Food Protection**, v. 67, n° 9, p. 1834-1840, 2004.

BERNAERTS, K.; VERSYCK, K. J.; VAN IMPE, J. F. On the design of optimal dynamic experiments for parameter estimation of a Ratkowsky-type growth kinetics at suboptimal temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 27-38, 2000.

BERNAERTS, K. et al. Optimal temperature input design for estimation of the Square Root model parameters: parameter accuracy and model validity restrictions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 145-157, 2002.

BERTSEKAS, D. P. **Nonlinear Programming**. 2a ed. Athena Scientific, Cambridge: 1999.

BIGELOW, W. D. The logarithmic nature of thermal death optimal value of the modified E-criterion for optimal time curves. **Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 528-536, 1921.

BORCH, E.; KANT-MADMANSB, M. L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat products. **International Journal of Food Microbiology**, 33, 103-120, 1996.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. Wiley, New York, 1978.

CAMARGO, A. P. R. S. **Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo**. 2015. (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CHEN, G.; CAMPANELLA, O. H. An optimization algorithm for estimation of microbial survival parameters during thermal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 52-58, 2012.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n° 6, p. 1417-1427, 2012.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. 2010. (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DALGAARD, P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 319-333, 1995.

DANTAS, O. D.; SILVA, E. M.; BARIONI, L. G.; OLIVEIRA, M. A. A.; LIMA, J. E. F. W. Comparação dos métodos GRG2 (solver do excel) e Downhill simplex para a parametrização da função beta. **XXXIX Simpósio Brasileiro de Pesquisa Operacional**, p. 1802-1809, 2007.

DOLAN, K. D.; VALDRAMIDIS, V.P.; MISHRA, D. K. Parameter estimation for dynamic microbial inactivation: which model, which precision? **Food Control**, v. 29, n° 2, p. 401-408, 2013.

DUSKOVA, M.; KAMENIK, J.; KARPISKOVA, R. *Weissella viridescens* in meat products – a review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, p. 237-241, 2013.

EGEA, J. A.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, M.; BANGA, J. R.; MARTÍ, R. Scatter search for chemical and bio-process optimization. **Journal of Global Optimization**, v. 37, p. 481-503, 2007.

FISHER, R. A. **The design of experiments**. Hafner Publishing Company New York, NY: 1935.

FRANCESCHINI, G.; MACCHIETTO, S. Model-based design of experiments for parameter precision: State of the art. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 4846-4872, 2008.

GIL, M. M.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying

temperature conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n° 1, p. 89–94, 2006.

GLOVER, F. Heuristics for integer programming using surrogate constraints. **Decision Sciences**, v. 8, p. 156-166, 1977.

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.

GRAM et al. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 79-97, 2002.

GRIJSPEERDT, K.; DE REU, K. Practical application of dynamic temperature profiles to estimate the parameters of the square root model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 83-92, 2005.

GRIJSPEERDT, K.; VANROLLEGHEM, P. Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. **Food Microbiology**, v. 16, p. 593-605, 1999.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365S-373S, 2001.

HUANG, L. A new mechanistic growth model for simultaneous determination of lag phase duration and exponential growth rate and a new Belehrádek-type model for evaluating the effect of temperature on growth rate. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, 1-7, 2010.

KIEFER, J. Optimum Experimental Designs. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 21, n° 2, p. 272-319, 1959.

KILCAST, D., SUBRAMANIAM, P. Chapter 1 – Introduction. Em: **The stability and shelf life of foods**. Eds. KILCAST, D., SUBRAMANIAM, P. CRC Press, Boca Raton: 2000.

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.

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

LASDON, L. S.; WAREN, A. D.; JAIN, A.; RATNER, M. Design and testing of a generalized reduced gradient code for nonlinear programming. **ACM Transactions on Mathematical Software**, v. 4, n. 1, p. 34-50, 1978.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas**. 2012. (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LONGHI, D. A. et al. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, n° 21, p. 88-96, 2013.

\_\_\_\_\_. Modeling the Growth of *Byssochlamys fulva* on Solidified Apple Juice at Different Temperatures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n° 6, p. 971-978, 2014.

MAIER, R. M. Chapter 3 - Bacterial Growth. Em: PEPPER, I. L., GERBA, C. P., GENTRY, T., MAIER, R. M. **Environmental Microbiology** (Second Edition), Academic Press, San Diego, p. 37-54, 2009.

MARTINS, W. F. **Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas**. 2015. (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

McMEEKIN, T. A.; MELLEFONT, L. A.; ROSS, T. Predictive Microbiology: past, present and future. Em: 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.

MELO, W. A. X. **Algoritmos para programação não linear inteira mista**. 2012. (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MERTENS, L.; VAN DERLINDEN, E.; VAN IMPE, J. F. (2011). Evaluating the effect of the experimental design schemes on parameter estimates of secondary square root-type models. Em: CUMMINS, E.; FRIAS, J. M.; VALDRAMIDIS, V. P. **Seventh international conference on predictive modelling in foods**, conference proceedings, p. 234-237, 2011.

MONOD, J. **Recherches Sur La Croissance Des Cultures Bactériennes**. Paris: 1942.

MUNACK, A. Optimization of sampling. Em: REHM, H.-J., REED, G. (Eds.). **Measuring, Modelling and Control, Biotechnology**, v. 4, VCH Weinheim, p. 252–264, 1991.

MUNACK, A. Optimal feeding strategy for identification of Monod-type models by fed-batch experiments. Em: FISH, N.; FOX, R.; THORNHILL, N. **Computer Applications in Fermentation Technology: Modelling and Control of Biotechnological Processes**, p. 195-204, Elsevier, Amsterdam, 1989.

MUNACK, A.; POSTEN, C. Design of optimal dynamical experiments for parameter estimation. **Proceedings of the 1989 American Control Conference**, Pittsburgh, PA, USA, p. 2010-2016, 1989.

NAHOR, H. B. et al. Optimal experimental design for the parameter estimation of conduction heated foods. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 109-119, 2001.

POSCHET, F. et al. Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. **Food Microbiology**, v. 20, n° 3, p. 285-295, 2003.

RATKOWSKY, D. A. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1-5, 1982.

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

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

ROSS, T. et al. Reply to: Response to letter to the editor: Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically tenderized beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, 83-84, 2011.

ROSSO, L. et al. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610-616, 1995.

SILVA, N. B. **Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado a vácuo**. 2015. (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SMITH, K. On the standard deviations of adjusted and interpolated values of an observed polynomial function and its constants and the guidance they give towards a proper choice of the distribution of observations. **Biometrika**, 12, 1-85, 1918.

SMITH-SIMPSON, S. et al. Estimating microbial growth parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, 294-303, 2007.

SOSA, N. G. M.; GALVÃO, R. D.; GANDELMAN, D. A. Algoritmo de busca dispersa aplicado ao problema clássico de roteamento de veículos. **Pesquisa Operacional**, v. 27, n. 2, p. 293-310, 2007.

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.

TREMARIN, A. et al. Modeling the growth of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* on solidified apple juice by measuring colony diameter and ergosterol content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, 23-28, 2015.

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.

VAN DERLINDEN, E.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J. F. Accurate estimation of cardinal growth temperatures of *Escherichia coli* from optimal dynamic experiments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 89-100, 2008.

VAN DERLINDEN, E.; MERTENS, L.; VAN IMPE, J. F. The impact of experiment design on the parameter estimation of cardinal parameter models in predictive microbiology. **Food Control**, v. 29, p. 300-308, 2013.

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.

VANROLLEGHEM, P. A.; DOCHAIN, D. **Bioprocess model identification**. Kluwer Academic Publishers, pp. 251-318, 1998.

VERSYCK, K. J. et al. Introducing optimal experimental design in predictive modeling: a motivating example. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 39-51, 1999.

WALTER, E.; PRONZATO, L. **Identification of Parametric Models from Experimental Data**. Springer, New York: 1997

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

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

ZHOU, K. et al. Modelling and predicting the effect of temperature, water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1956-1965, 2008.

ZIMMERMANN et al. Predicting *Bacillus coagulans* Spores Inactivation in Tomato Pulp under Nonisothermal Heat Treatments. **Journal of Food Science**, v. 79, n° 5, p. M935-M940, 2014.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.



## 7 APÊNDICE A

No item 4.1 foi mencionado que o valor do parâmetro  $y_0$  normalmente é estimado pelo ajuste do modelo matemático aos dados experimentais. Entretanto, o valor de  $y_0$  pode ser obtido também diretamente dos dados experimentais. Portanto, este apêndice tem como objetivo fazer uma breve análise sobre o impacto da fixação do valor de  $y_0$  na estimativa dos outros parâmetros ( $h_0$ ,  $\mu_{max}$  e  $y_{max}$ ) do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Os parâmetros do modelo primário foram estimados para as seis condições isotérmicas em meio de cultivo (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C), com as duas estratégias: com o valor de  $y_0$  experimental fixo ( $y_{0-fix}$ ) e com o valor de  $y_0$  estimado no ajuste ( $y_{0-est}$ ).

O modelo de Baranyi e Roberts foi estimado em duas etapas (item 3.3.1). Na primeira etapa, os valores dos parâmetros  $\mu_{max}$ ,  $h_0$ ,  $y_{max}$  e  $y_0$  em cada temperatura foram estimados, e o valor da média aritmética do parâmetro  $h_0$  foi calculado (que é definido como o estado fisiológico inicial das células). Na segunda etapa, o valor médio de  $h_0$  foi fixo e os demais parâmetros do modelo ( $\mu_{max}$ ,  $y_{max}$  e  $y_0$ ) foram estimados novamente pelo ajuste do modelo aos dados experimentais.

Os valores do parâmetro  $h_0$  estimados na primeira etapa do ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo com os valores de  $y_0$  experimental fixo ( $y_{0-fix}$ ) e  $y_0$  estimado no ajuste ( $y_{0-est}$ ) são apresentados na Tabela 7.1. De forma geral, é possível observar que os valores estimados para o parâmetro  $h_0$  foram maiores com a fixação do valor de  $y_0$  (exceto para um conjunto de dados a 12 °C e outro a 30 °C). Consequentemente, a média dos valores de  $h_0$  obtida com  $y_{0-fix}$  também foi maior que a média dos valores de  $h_0$  obtida com  $y_{0-est}$ . A partir dos resultados a 4, 20 e 30 °C, é possível deduzir que o valor do parâmetro  $y_0$  influencia a estimativa do parâmetro  $h_0$ , sendo que valores maiores para o parâmetro  $y_0$  resultam em valores maiores também para  $h_0$ . Portanto, o valor do parâmetro  $y_0$  é geralmente subestimado no ajuste do modelo matemático em relação ao seu valor observado experimentalmente, e consequentemente, influencia na subestimação do valor do parâmetro  $h_0$ .

O desvio padrão (DP) da média de  $h_0$  obtido com  $y_{0-fix}$  (DP = 0,19) foi maior do que o DP da média de  $h_0$  obtido com  $y_{0-est}$  (DP = 0,14). Como há uma superestimação dos valores de  $h_0$  obtidos com  $y_{0-fix}$  (explicada no parágrafo acima), consequentemente haverá também um maior desvio padrão entre seus valores estimados.

Tabela 7.1 – Valores do parâmetro  $h_0$  estimados no ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts aos dados experimentais (repetição: *Set* 1 e 2) do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo com os valores de  $y_0$  experimental fixo ( $y_{0\text{-fix}}$ ) e  $y_0$  estimado no ajuste ( $y_{0\text{-est}}$ ), e média dos valores de  $h_0$  estimados ( $\pm$  desvio padrão).

Parâmetro	Set	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	30 °C	Média ( $\pm$ DP)
$h_0$ (com $y_{0\text{-est}}$ )	1	0,000	0,000	0,205	0,000	0,329	0,010	0,063
	2	0,006	0,000	0,000	0,000	0,107	0,097	( $\pm$ 0,140)
$y_{0\text{-est}}$	1	7,78	8,87	8,45	8,29	8,53	8,00	
	2	8,20	8,14	8,64	8,31	7,78	8,36	
$h_0$ (com $y_{0\text{-fix}}$ )	1	0,000	0,000	0,128	0,000	0,630	0,000	0,108
	2	0,101	0,000	0,000	0,000	0,313	0,127	( $\pm$ 0,190)
$y_{0\text{-fix}}$	1	7,80	8,41	8,52	8,06	8,79	8,00	
	2	8,27	8,10	8,62	8,20	7,98	8,46	

Os valores dos parâmetros  $\mu_{max}$  e  $y_{max}$  estimados na segunda etapa do ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts aos dados experimentais do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo com os valores de  $y_0$  experimental fixo ( $y_{0\text{-fix}}$ ) e  $y_0$  estimado no ajuste ( $y_{0\text{-est}}$ ) são apresentados na Tabela 7.2. Para todos os ajustes, o parâmetro  $h_0$  foi fixo com o valor de 0,0629. De forma geral, é possível observar que os valores estimados para os parâmetros  $\mu_{max}$  e  $y_{max}$  foram muito próximos tanto com  $y_{0\text{-fix}}$  quanto com  $y_{0\text{-est}}$  para cada conjunto de dados experimentais. Portanto, não foi possível identificar qualquer impacto sistemático nos valores estimados dos parâmetros  $\mu_{max}$  e  $y_{max}$  com a fixação do valor de  $y_0$ .

Em uma análise complementar, o modelo secundário da Raiz Quadrada foi ajustado aos valores do parâmetro  $\mu_{max}$  estimados com  $y_{0\text{-fix}}$  e com  $y_{0\text{-est}}$  (resultado do item 4.1). Os valores estimados para os parâmetros do modelo secundário com  $y_{0\text{-fix}}$  foram  $b = 0,0287$  ( $\pm 0,0019$ )  $\text{h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,46$  ( $\pm 1,22$ )  $^\circ\text{C}$  ( $R^2 = 0,991$  e  $RMSE = 0,025$ ), enquanto que os valores estimados com  $y_{0\text{-est}}$  foram  $b = 0,0290$  ( $\pm 0,0020$ )  $\text{h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $T_{min} = -1,33$  ( $\pm 1,26$ )  $^\circ\text{C}$  ( $R^2 = 0,991$  e  $RMSE = 0,026$ ). Portanto, não há um ganho de informação significativo na estimativa dos parâmetros do modelo secundário com  $y_{0\text{-fix}}$  ou  $y_{0\text{-est}}$ .

Tabela 7.2 – Parâmetros (Par) estimados ( $\pm$  intervalos de confiança a 95%) no ajuste do modelo primário de Baranyi e Roberts aos dados experimentais (repetição: Set 1 e 2) do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo com os valores de  $y_0$  experimental fixo ( $y_{0\text{-fix}}$ ) e  $y_0$  estimado ( $y_{0\text{-est}}$ ) no ajuste.

Set	Par	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C	30 °C
1	$y_{0\text{-est}}$	7,80 ( $\pm 0,20$ )	8,89 ( $\pm 0,28$ )	8,45 ( $\pm 0,21$ )	8,31 ( $\pm 0,29$ )	8,39 ( $\pm 0,34$ )	8,02 ( $\pm 0,41$ )
	$\mu_{\text{max}}$	0,0177 ( $\pm 0,0008$ )	0,0686 ( $\pm 0,0037$ )	0,1598 ( $\pm 0,0052$ )	0,2542 ( $\pm 0,0123$ )	0,4126 ( $\pm 0,0235$ )	0,8243 ( $\pm 0,0469$ )
	$y_{\text{max}}$	19,52 ( $\pm 0,16$ )	20,72 ( $\pm 0,20$ )	21,46 ( $\pm 0,19$ )	21,25 ( $\pm 0,23$ )	21,73 ( $\pm 0,30$ )	21,69 ( $\pm 0,29$ )
	$R^2$	0,996	0,992	0,997	0,994	0,995	0,993
	$RMSE$	0,304	0,410	0,250	0,402	0,402	0,421
	$y_{0\text{-fix}}$	7,80	8,41	8,52	8,06	8,79	8,00
1	$\mu_{\text{max}}$	0,0177 ( $\pm 0,0006$ )	0,0744 ( $\pm 0,0029$ )	0,1583 ( $\pm 0,0030$ )	0,2631 ( $\pm 0,0082$ )	0,3920 ( $\pm 0,0165$ )	0,8269 ( $\pm 0,0265$ )
	$y_{\text{max}}$	19,52 ( $\pm 0,16$ )	20,65 ( $\pm 0,22$ )	21,47 ( $\pm 0,19$ )	21,22 ( $\pm 0,23$ )	21,77 ( $\pm 0,34$ )	21,68 ( $\pm 0,28$ )
	$R^2$	0,996	0,990	0,997	0,993	0,993	0,993
	$RMSE$	0,300	0,458	0,248	0,412	0,445	0,413
	$y_{0\text{-est}}$	8,21 ( $\pm 0,24$ )	8,16 ( $\pm 0,20$ )	8,65 ( $\pm 0,38$ )	8,33 ( $\pm 0,19$ )	7,76 ( $\pm 0,24$ )	8,37 ( $\pm 0,26$ )
2	$\mu_{\text{max}}$	0,0258 ( $\pm 0,0012$ )	0,0574 ( $\pm 0,0020$ )	0,1510 ( $\pm 0,0093$ )	0,2720 ( $\pm 0,0081$ )	0,4353 ( $\pm 0,0146$ )	0,7378 ( $\pm 0,0288$ )
	$y_{\text{max}}$	19,68 ( $\pm 0,18$ )	20,49 ( $\pm 0,18$ )	21,18 ( $\pm 0,30$ )	21,68 ( $\pm 0,15$ )	21,91 ( $\pm 0,19$ )	21,76 ( $\pm 0,17$ )
	$R^2$	0,995	0,996	0,992	0,998	0,997	0,997
	$RMSE$	0,338	0,302	0,430	0,224	0,295	0,282
	$y_{0\text{-fix}}$	8,27	8,10	8,62	8,20	7,98	8,46
2	$\mu_{\text{max}}$	0,0256 ( $\pm 0,0008$ )	0,0579 ( $\pm 0,0013$ )	0,1517 ( $\pm 0,0054$ )	0,2767 ( $\pm 0,0049$ )	0,4241 ( $\pm 0,0089$ )	0,7300 ( $\pm 0,0168$ )
	$y_{\text{max}}$	19,68 ( $\pm 0,18$ )	20,48 ( $\pm 0,18$ )	21,17 ( $\pm 0,29$ )	21,66 ( $\pm 0,14$ )	21,93 ( $\pm 0,19$ )	21,77 ( $\pm 0,17$ )
	$R^2$	0,995	0,996	0,992	0,998	0,997	0,997
	$RMSE$	0,334	0,299	0,422	0,227	0,307	0,279
	$y_{0\text{-fix}}$	8,27	8,10	8,62	8,20	7,98	8,46