

BOLETIM DE

biotecnologia

Orgão oficial da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia \\[spbt](#) \\
Número 78 \\
Setembro de 2004 \\
Edição Trimestral ISSN 1645-5878

EM DESTAQUE

Bioengenharia de Células Estaminais



A Microbiologia Preditiva como Instrumento da Garantia da Segurança de Produtos Alimentares

AUTORES:

Fátima A. Miller, M^a Manuel Gil, Teresa R. S. Brandão e Cristina L. M. Silva

INSTITUIÇÃO:

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa

E-MAIL: crislui@esb.ucp.pt

Abstract

The quality and safety of products is of great importance to food industry. In terms of public health, the appropriate control of growth and/or inactivation of microorganisms is crucial. No contamination by microorganisms responsible for degradation is as well important to assure food quality along the distribution chain.

The main microorganisms responsible for foodborne diseases are: Campylobacter spp, Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella spp. Studies on the effect of several factors, such as process time-temperature, pH and water activity, on microbial behaviour are fundamental to attain the appropriate control of foods' quality.

The development of mathematical models (predictive microbiology) that describe the microorganisms' inactivation is therefore important and it is a relatively new researching field.

In this work a review on inactivation kinetics of microorganisms and mathematical models commonly used to describe this behaviour (primary, secondary and tertiary) is presented. Based on a critical analysis of available information, new research lines are suggested.

KEYWORDS: Predictive microbiology, foods, quality, safety, pathogenic microorganisms.

Resumo

A segurança e qualidade dos alimentos é um assunto de importância fundamental para a indústria. Em termos de saúde pública, o controlo do crescimento e/ou inactivação de microorganismos assume um papel crucial. Por outro lado, a ausência de contaminação por microorganismos que degradam parâmetros de qualidade é importante para a sua distribuição com a qualidade exigida e adequada. Os principais microorganismos actualmente responsáveis por surtos epidémicos são: *Campylobacter spp*, *Escherichia coli*,

Listeria monocytogenes e *Salmonella spp*. A compreensão do efeito que diversos factores, tais como condições de tempo, temperatura, pH e actividade da água, têm no comportamento destes microorganismos é de uma importância extrema para o controlo de qualidade alimentar.

O desenvolvimento de modelos matemáticos (microbiologia preditiva) que descrevem a inactivação de microorganismos em alimentos é crucial, constituindo uma área de investigação recente.

Neste trabalho é apresentada uma análise e compilação sobre cinéticas de inactivação dos microorganismos, em combinação com a apresentação do estado da arte em termos de modelos disponíveis (modelos primários, secundários e terciários). Finalmente, são sugeridas novas linhas de investigação, baseadas numa análise crítica da informação disponível.

PALAVRAS CHAVE: microbiologia preditiva, alimentos, qualidade, segurança, microorganismos patogénicos.

Introdução

A modelagem matemática é de extrema importância para o planeamento, avaliação, optimização e controlo de qualquer processo. No caso mais particular de processos alimentares, o desenvolvimento e aplicação de modelos, capazes de descrever de uma forma precisa e exacta o comportamento de uma variável em estudo, é fundamental para a previsão de propriedades e/ou características finais dos produtos. Tal poderá ser de importância extrema quando a garantia de segurança de um produto alimentar é o objectivo a atingir. Nesta área, a abordagem matemática tem vindo a assumir um papel de crescente protagonismo, devido ao esforço conjunto que microbiólogos, matemáticos e engenheiros alimentares têm dedicado a estes estudos. Microbiologia predictiva é o termo vulgarmente utilizado para descrever os estudos de modelagem matemática aplicados ao comportamento de microorganismos.

Problemas de saúde pública associados a alimentos contaminados por microrganismos patogénicos ocorrem com frequência, verificando-se na União Europeia um aumento da incidência de contaminações. A maioria destes surtos está associada a carnes, frutos e vegetais frescos. Os microrganismos responsáveis por estas epidemias são *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* A manipulação inadequada dos alimentos, a aplicação de tratamentos térmicos não eficazes e a ausência de padrões de higiene, são as principais causas destas ocorrências. Características específicas de alguns destes microrganismos, nomeadamente a ubiquidade aliada à capacidade de resistir a temperaturas de refrigeração (caso da *Listeria*) e mesmo a temperaturas de congelação (caso da *E. coli*), tornam estas bactérias perigosos contaminantes. A sua presença, mesmo em número escasso de células, constitui um grande risco para a saúde dos consumidores. É pois, de importância inquestionável, o estudo de processos que permitam inactivar microrganismos patogénicos. A aplicação de tratamentos térmicos eficazes, capazes de uma inactivação adequada, é de importância fundamental. A previsão da carga microbiana em alimentos quando sujeitos a um processamento é conseguida pela modelagem dos processos. Os modelos matemáticos deverão incluir o efeito de todas as variáveis do processo, por forma a que um eficaz controlo de qualidade possa ser assegurado, com subsequentes garantias de distribuição e comercialização de alimentos seguros para o consumidor.

Factores que afectam a inactivação microbiana

A temperatura é provavelmente o factor ambiental mais importante que afecta o crescimento e a viabilidade dos microrganismos. Por este motivo, tratamentos térmicos são os mais aplicados a alimentos de forma a garantir a sua qualidade e segurança.

A severidade do processo térmico depende obviamente do microrganismo conjugado com a natureza do alimento, o que origina com frequência a necessidade de controlo de factores adicionais, tais como o pH e a actividade da água do meio. Assim, este trabalho pretende reunir alguns dos aspectos mais importantes revelados em estudos publicados, usando estes factores para inactivar os microrganismos de maior preocupação alimentar.

Na Figura 1 está representada uma curva típica de inactivação de *Listeria monocytogenes* sujeita a um processo de pasteurização. Dependendo da temperatura utilizada, o microrganismo apresenta uma fase de latência inicial (L), seguida de um decréscimo do número de microrganismos a uma taxa máxima (k). Em alguns casos específicos, e dependendo da conjugação microrganismo/alimento, pode ocorrer uma fase final de estabilização do número de microrganismos para um valor residual (N_{res}), o que revela uma resistência dos microrganismos ao tratamento térmico aplicado.

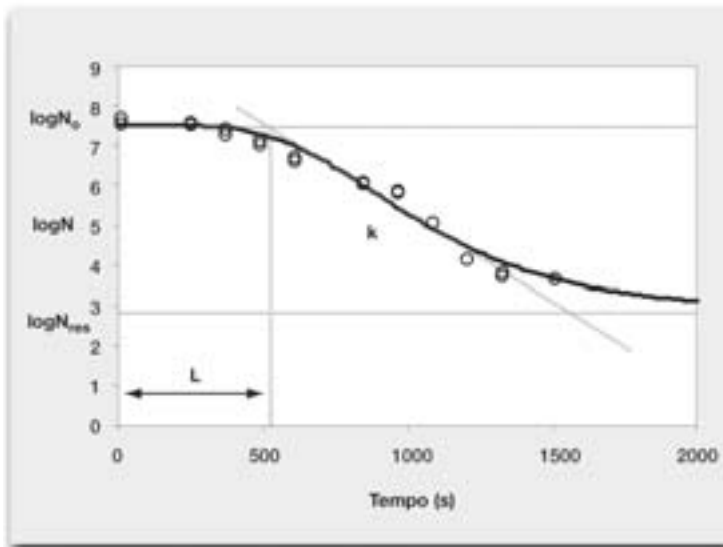


Figura 1: Inactivação de *Listeria monocytogenes* em nata a 56°C.

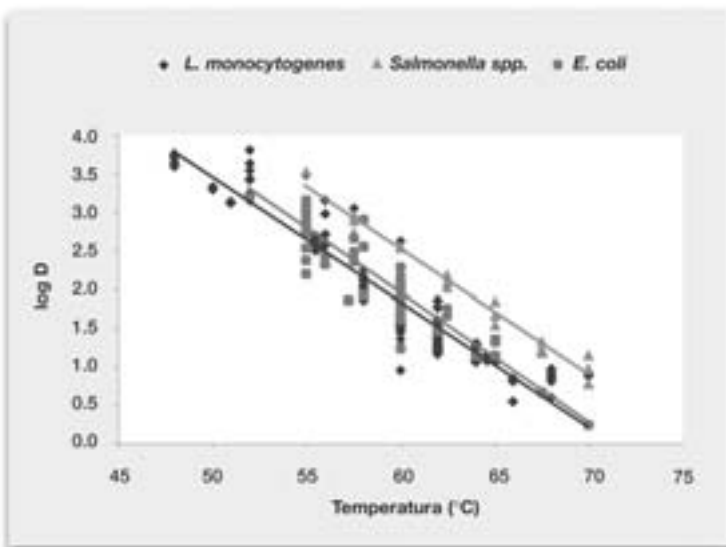
Dados: Casadei *et al.* (1998)

Em tratamentos térmicos mais severos, a fase de latência inicial pode não existir ou ser de extensão desprezável. O comportamento de inactivação dos microrganismos apresenta um comportamento linear, pelo que o cálculo do inverso do declive da recta de ajuste permite estimar o convencional parâmetro D (i.e. o tempo necessário para redução de um ciclo logarítmico da carga microbiana). Este parâmetro traduz a resistência da bactéria a uma dada temperatura. Inúmeros trabalhos têm vindo a ser publicados com estudos de resistência térmica de uma vasta variedade de microrganismos. Contudo, esses estudos são geralmente realizados em meio de cultura e não em produtos alimentares, com excepção de carne, leite e seus derivados que já foram alvo de várias análises.

No sentido de extrair uma informação clara e elucidativa dos trabalhos divulgados sobre o efeito da temperatura na resistência de patogénicos, foi construído o gráfico da Figura 2.

Recolheram-se dados experimentais da literatura (de um total de 13 artigos científicos) de valores de D de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., em diferentes meios e alimentos. A análise dos resultados permite concluir que a resistência térmica de todos os microrganismos diminuiu com o aumento de temperatura (na gama de 48 a 70°C).

Figura 2: Efeito da temperatura na resistência térmica de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.



A sensibilidade à temperatura é vulgarmente avaliada com base no parâmetro z (calculado através do inverso do declive das rectas de variação de logaritmo de D versus temperatura), traduzindo o incremento de temperatura necessário para diminuir um ciclo logarítmico em D. Quanto maior o valor de z, menor a sensibilidade do patogénico em relação à temperatura. Os valores de z calculados com base nos dados experimentais da Figura 2 foram semelhantes para as três bactérias (valores de z entre 6.0 e 6.2°C). O pH é um dos factores que tem uma forte influência na resistência térmica das bactérias. Verifica-se que, para meios com pH de cerca de 6.0, a resistência térmica é máxima. À medida que o pH diminui, a sensibilidade do microorganismo à temperatura aumenta.

A actividade da água (a_w) assume também um papel muito importante na inactivação dos microrganismos. A maioria dos trabalhos publicados indica que a tolerância térmica das bactérias aumenta com a diminuição da a_w , embora existam trabalhos que mencionam que essa tolerância pode aumentar ou diminuir à medida que a_w diminui. A combinação dos factores temperatura, pH e a_w afecta pois a resistência microbiana. A inactivação térmica dos microrganismos aumenta com a diminuição do pH e com o aumento de a_w .

Modelos matemáticos

Modelos cinéticos são expressões matemáticas que relacionam uma resposta particular medida no tempo, sob circunstâncias ambientais específicas.

Estes modelos requerem a definição dos parâmetros (e.g. energia de activação e constante de reacção), que devem ser estimados com precisão (Schaffner e Labuza, 1997; Dens e Van Impe, 2001). Os parâmetros cinéticos são directamente dependentes dos factores ambientais, tais como temperatura, pH e actividade da água. Estes factores são os mais importantes para as cinéticas de crescimento/inactivação de microrganismos.

Whiting e Buchanan (1994) propuseram um esquema de classificação de modelos, que os divide em primários, secundários e terciários, e que será apresentado nas subsecções seguintes.

Modelos primários

Estes modelos relacionam o número de microrganismos que sobrevivem, sob circunstâncias ambientais particulares, com tempo (modelos cinéticos). Quantificam unidades formadoras de colónias por mililitro/miligramma (ufc/ml), formação de toxinas, níveis de substrato, produtos metabólicos (que são medidas directas da resposta), ou a absorvância ou a impedância (que são medidas indirectas da resposta).

Os parâmetros cinéticos, tais como o tempo de inactivação/geração, a duração da fase de latência, a taxa exponencial de inactivação/crescimento e a densidade mínima/máxima da população, podem ser estimados quando os modelos preliminares são ajustados aos dados experimentais.

Um resumo dos modelos primários frequentemente utilizados é apresentado em seguida (Dens e Van Impe, 2001):

Modelo de 1ª ordem de Monod

$$\log N = a - kt \quad (1)$$

Função Logística

$$\log N = \frac{c}{1 + e^{k(t-l)}} \quad (2)$$

Modelo Modificado de Gompertz

$$\log N = b \times \left(1 - e^{-e^{k(L-t)+1}}\right) \quad (3)$$

onde:

- a** logaritmo do tamanho da população inicial
- c,b** constantes do modelo
- N** tamanho da população (número de microrganismos/unidade de volume ou massa)
- t** tempo de processamento (minuto)
- l** ponto de inflexão da curva (minuto)
- k** taxa de reacção (minuto⁻¹)
- L** fase de latência (minuto)

Modelos secundários

Estes modelos descrevem a dependência dos parâmetros cinéticos, estimados previamente utilizando os modelos preliminares, com os factores ambientais.

O modelo de Arrhenius (ou a sua forma linearizada) é o mais frequentemente utilizado, na descrição da dependência dos parâmetros cinéticos, com a temperatura:

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4)$$

ou

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

onde k_0 e E_a são o factor pre-exponencial e a energia de activação, respectivamente, e R é a constante dos gases ideais.

O modelo de Arrhenius pode ser reparametrizado utilizando uma temperatura finita da referência, T_{ref} :

$$k = k_{ref} \exp\left(-\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad (6)$$

onde o k_{ref} é a taxa de reacção avaliada em T_{ref} .

Uma outra expressão importante é a equação de Davey, baseada na forma linearizada da equação de Arrhenius, mas incluindo ambos os efeitos da temperatura (T) e da a_w :

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} + C_3 a_w + C_4 a_w^2 \quad (7)$$

onde C_0, C_1, C_2, C_3, C_4 são constantes do modelo.

Na Tabela 1 alguns outros modelos são apresentados. Estes modelos são frequentemente referidos como modelos do tipo raiz-quadrada.

Modelos terciários

Os modelos terciários são rotinas de software que utilizam modelos primários e secundários, produzindo programas de utilização amigável para os utilizadores dos modelos. Estes programas podem calcular respostas microbiológicas às alterações das condições envolventes, comparar os efeitos nos microrganismos quando submetidos a diferentes condições, ou comparar o comportamento de diversos microrganismos. Alguns dos programas disponíveis, na área da microbiologia preditiva são:

- Food Micromodel (1992)
- Food Spoilage Predictor
- Pathogen Modelling Program (nova versão 1998)
O programa pode ser obtido através da Internet (<http://www.arserrc.gov>)
- Chefcad Software
- Decision support system
- Forecast bureau service
- MIRINZ-software

Estes programas focalizam essencialmente o comportamento do crescimento e uma falta da informação no que diz respeito à estimativa dos parâmetros cinéticos é notória.

Modelo	Referência
$\sqrt{k} = b(T - T_{min})$	Ratkowsky <i>et al.</i> (1982)
$\sqrt{k} = b(T - T_{min})\sqrt{(a_w - a_{wmin})}$	McMeekin <i>et al.</i> (1987)
$\sqrt{k} = b(T - T_{min})\sqrt{(pH - pH_{min})}$	Adams <i>et al.</i> (1991)
$\sqrt{k} = b(T - T_{min})\sqrt{(a_w - a_{wmin})}\sqrt{(pH - pH_{min})}$	McMeekin <i>et al.</i> (1992)

Tabela 1: Resumo dos modelos do tipo raiz-quadrada encontrados na literatura
Nota: o "min" corresponde a um mínimo do valor do factor

Análise crítica

O desenvolvimento de tratamentos térmicos eficazes e controlados é crucial na produção de produtos alimentares seguros e de qualidade. A microbiologia predictiva assume aqui um papel fundamental, constituindo também uma ferramenta imprescindível no design de novos processos. Na última década tem vindo a verificar-se um esforço, por parte dos microbiólogos em utilizar os conceitos matemáticos potenciados com uma adequada análise estatística dos resultados. No entanto, um vasto caminho deverá ainda ser percorrido, designadamente no sentido de aplicação de planeamentos experimentais apropriados. A variabilidade do comportamento microbiano, face aos diferentes alimentos e condições de processamento, justificam a necessidade de uma validação cuidada dos modelos que possam ser desenvolvidos e aplicados. A maior parte do trabalho experimental que tem vindo a ser desenvolvido, com o objectivo de obtenção de modelos cinéticos na área da microbiologia, é realizado em condições estáticas de temperatura, pH e actividade da água. No entanto, estas condições não são verificadas na maioria dos processos alimentares. Parâmetros de inactivação de microrganismos estimados com base em condições estáticas deverão ser utilizados com restrição e controlo em situações reais. O perigo de uma sub-estimação da carga microbiana pode verificar-se (Gil *et al.*, 2004). Com estes exemplos pretende-se alertar que, apesar do considerável grau de complexidade dos fenómenos envolvidos na inactivação microbiana, a microbiologia predictiva é sem dúvida uma ferramenta indispensável no controlo de situações que, de uma forma determinante, são responsáveis pela segurança dos produtos.

Agradecimentos

O primeiro autor agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia a bolsa de investigação SFRH/BD/11358/2002.

Referências

- ADAMS, M. R., LITTLE, C.L., EASTER, M.C. (1991) Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 65-71.
- CASADEI, M. A., ESTEVES DE MATOS, R., HARRISON, S.T., GAZE, J.E. (1998) Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products as affected by the growth medium. *Journal of Applied Microbiology* 84: 234-239.
- DENS, E. J., VAN IMPE, J.F. (2001) On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology* 64: 247-260.
- GIL, M.M., BRANDÃO, T.R.S., SILVA, C.L.M. (2004) Modelling microbial inactivation kinetics under time-varying temperature conditions. Proceedings of International Conference on Engineering and Food (ICEF9), Montpellier, França.
- McMEEKIN, T. A., CHANDLER, R.E., DOE, P.E., GARLAND, C.D., OLLEY, J., PUTRO, S., RATKOWSKY, D.A. (1987) Model for the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *Journal of Applied Bacteriology* 62: 543-550.
- McMEEKIN, T. A., ROSS, T., OLLEY, J. (1992) Application of predictive microbiology to assure quality and safety of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 15: 13-32.
- RATKOWSKY, D. A., OLLEY, J., McMEEKIN, T.A., BALL, A. (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal Bacteriology* 149: 1-5.
- SCHAFFNER, D. W., LABUZA, T.P. (1997) Predictive microbiology: where are we, and where are we going? *Food Technology* 51(4): 95-99.
- WHITING, R. C., BUCHANAN, R.L. (1994) Microbial Modeling. A scientific status summary by the Institute of Food Technologists. *Food Technology* 48(6): 113-120.