



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO E PREDIÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO  
MICROBIANO VIA PRÁTICAS ESTEREOLÓGICAS.**

**LÍVIA DE AQUINO GARCIA MOURA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Nathália Ramos de Melo**

*Co-orientador*  
**Wesley Luiz da Silva Assis**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Março de 2018.

M929c Moura, Livia de Aquino Garcia, 1987-  
Caracterização e Predição da cinética de crescimento  
microbiano via práticas estereológicas / Livia de  
Aquino Garcia Moura. - 2018.  
62 f.: il.

Orientadora: Nathália Ramos de Melo.  
Coorientadora: Wesley Luiz da Silva Assis.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação de  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2018.

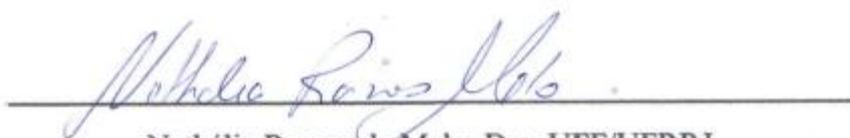
1. Microbiologia Preditiva. 2. Estereologia  
Quantitativa. I. Melo, Nathália Ramos de, 1975-,  
orient. II. Assis, Wesley Luiz da Silva, 1979-,  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**LÍVIA DE AQUINO GARCIA MOURA**

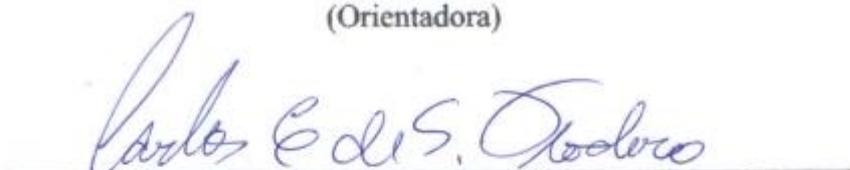
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/03/2018.



Nathália Ramos de Melo. Dra. UFF/UFRRJ

(Orientadora)



Carlos Eduardo de Souza Teodoro. Dr UFF



Rosa Helena Luchese. Dra UFRRJ

## DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar eu dedico a Deus, porque mesmo diante todas as dificuldades Ele nunca me desamparou.

“Portanto dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória perpetuamente! Amém”.

Romanos 11:36.

À minha filha Milena Garcia Moura, por ser o meu raio de luz, a minha maior força, minha razão de existir!!! Um dia ela entenderá que toda minha ausência foi para proporcionar uma vida melhor pra ela!

Aos meus pais, Wanda M<sup>a</sup> S. de Aquino Garcia e José Carlos Alves Garcia, pelo amor incondicional, meus melhores amigos, aqueles que posso confiar de olhos fechados por todo apoio e incentivo, por serem o meu melhor e maior exemplo de vida!

Ao meu amado esposo Isaque M. S. Moura, que foi incansável em vários momentos, sempre me apoiando, me ajudando tanto no meu trabalho de dissertação, quanto em casa nas minhas atividades! Deus me presenteou com a sua presença em minha vida! Muito obrigada por tudo!

Ao meu irmão Leandro de A. Garcia e minha cunhada Priscila Garcia, pela amizade, carinho, torcida e todo apoio durante os meus momentos.

## AGRADECIMENTOS

À minha professora, orientadora D.Sc. Nathália Ramos de Melo, que em uma tarde abriu as portas da sua sala para me receber, e dali para frente minha vida se transformou. O meu muito obrigada por todas as oportunidades, pelo apoio á minha qualificação e crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador D.Sc. Wesley Luiz da S. Assis por todo o aprendizado, companheirismo, dedicação, por sempre ter um sorriso e uma palavra amiga. Por ter acreditado desde o início que seria possível desenvolver o meu trabalho mesmo diante todas as incertezas e dificuldades.

Ao professor e amigo D.Sc. Bernardo de Sá Costa, por sempre estar disposto a ajudar, suas dicas e contribuições foram de extrema importância para concretização do nosso trabalho.

À professora D.Sc. Raquel Souza, chefe do Departamento de Agronegócios da UFF, por sempre me apoiar e incentivar.

À Professora D.Sc. Maria Ivone Martins, coordenadora do PPGCTA, por todo auxílio e cordialidade durante estes dois anos.

À secretária do PPGCTA Lucimar Storck Teixeira por sempre estar disposta a me ajudar, seu trabalho é fundamental para nós.

Aos meus primos Wilson Aquino, Patrícia Carvalho e João Henrique, por sempre me apoiarem e torcerem pela minha vitória.

Aos meus amigos Rafaela F. Barbosa e Alexandre Barbosa e seus filhos Alice e Miguel por todo companheirismo, amizade e carinho com a minha filha nos meus momentos de ausência.

Aos meus amigos Daiani e Marcos Melado, por todas as risadas e momentos de descontração, que me ajudaram a recuperar o fôlego.

Às minhas amigas Flávia Capobianco e Fabrícia Oliveira por terem me incentivado desde o início a prosseguir. Obrigada pelos almoços e cafés que sempre me aliviaram nos momentos de estresse! E me ajudaram a manter o equilíbrio sem perder o foco!

Aos meus amigos Alexandre Lemos, Emerson Silva e Matheus Silva, por estarem sempre presentes na minha vida profissional e pessoal, me apoiando e ajudando!

Aos amigos do LAETec, obrigada por todo companheirismo e aprendizagem.

## RESUMO

MOURA, Livia de Aquino Garcia. **Caracterização e Predição da cinética de crescimento microbiano via práticas estereológicas**. 2018. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A microbiologia preditiva utiliza modelos matemáticos para prever o crescimento e multiplicação de microrganismos, sendo utilizada como uma ferramenta para garantir a segurança dos alimentos. A estereologia quantitativa apresenta uma forma simples e confiável de medições de estruturas possibilitando uma substituição à forma de determinação dos modelos preditivos. O objetivo deste trabalho foi utilizar medições estereológicas como uma ferramenta para a microbiologia preditiva, substituindo os métodos matemáticos tradicionalmente utilizados. Foi utilizado como objeto de estudo o fungo *Penicillium sp.* Deste foram inoculadas 6 gotas distintas de uma solução preparada em água peptonada 0,1% contendo  $10^8$  UFC/ml de esporos sobre o meio àgar BDA geleificado em placa de Petri. As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$ , e fotografadas de 2 em 2 horas por 7 dias para observação do desenvolvimento das colônias. As fotos foram tratadas utilizando o programa ImageJ®, obtendo-se o valor da área individual das colônias ( $A_A$ ), e a área total ( $A_T$ ). Aplicando a estereologia quantitativa, foi possível determinar uma equação para correlacionar  $A_A$  e  $A_T$ , obtendo-se o valor da Fração Volumétrica, isso tendo tratado os dados utilizando o programa Excel®. Então procedeu-se à elaboração dos gráficos através do software Mathematica® e por fim foi ajustado um modelo matemático, curva de crescimento experimental do *Penicillium sp.*, através do Excel®. O modelo linear foi o que melhor se adequou para representar o crescimento microbiano. O fungo apresentou uma taxa de adaptação de 0 a 16 h, com pico de crescimento entre 50-58 h e até ao fim de 168 h não observou-se declínio na curva de crescimento. Houve sobreposição das curvas de crescimento das 6 colônias apresentando o mesmo perfil, relacionando-se à característica de reprodução fúngica. Realizou-se o ajuste linear através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), obtendo-se o valor de 0,96, 0,99 e 0,98 para ajuste de 0-50h, 52-168h e o total de horas, respectivamente, considerados um bom ajuste. Os resultados encontrados possibilitaram visualizar uma nova técnica, para predição do desenvolvimento microbiológico, utilizando as ferramentas da estereologia quantitativa, viabilizando a segurança dos alimentos e, implementando uma nova perspectiva para análise e processos de conservação de alimentos.

**Palavras chave:** Predição microbiana; Estereologia quantitativa; Segurança dos alimentos.

## ABSTRACT

MOURA, Livia de Aquino Garcia. **Characterization and Prediction of microbial growth kinetics via stereological practices.** 2018. 62p. Dissertation (Master in Science and Food Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, University Federal Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Predictive microbiology uses mathematical models to predict the growth and multiplication of microorganisms and is used as a tool to ensure food safety. The quantitative stereology presents a simple and reliable form of measurements of structures allowing a substitution to the form of determination of the predictive models. The objective of this work was to use stereological measurements as a tool for predictive microbiology, replacing the traditionally used mathematical methods. The fungus *Penicillium sp.* From this, 6 different drops of a solution prepared in 0.1% peptone water containing  $10^8$  CFU / ml spores were inoculated onto the BDA agar agar medium gelled in Petri dishes. The plates were incubated at 25 ° C and photographed 2 in 2 hours for 7 days to observe the development of the colonies. The photos were treated using the ImageJ<sup>®</sup> program, obtaining the value of the individual area of the colonies ( $A_A$ ), and the total area ( $A_T$ ). Applying the quantitative stereology, it was possible to determine an equation to correlate  $A_A$  and  $A_T$ , obtaining the value of the Volumetric Fraction, this having treated the data using the Excel<sup>®</sup> program. Then, the graphs were elaborated through the software Mathematica<sup>®</sup> and finally a mathematical model, the experimental growth curve of *Penicillium sp.*, was adjusted through Excel<sup>®</sup>. The linear model was the one best suited to represent microbial growth. The fungus presented an adaptation rate of 0 to 16 h, with growth peak between 50-58 h and until the end of 168 h no growth curve was observed. There were overlapping of the growth curves of the 6 colonies presenting the same profile, related to the characteristic of fungal reproduction. The linear adjustment was performed through the coefficient of determination ( $R^2$ ), obtaining a value of 0.96, 0.99 and 0.98 for adjustment of 0-50h, 52-168h and total hours, respectively, considered a good fit. The results allowed the visualization of a new technique for the prediction of microbiological development, using the tools of quantitative stereology, enabling food safety and, implementing a new perspective for food preservation analysis and processes.

**Keywords:** Microbial prediction; Quantitative Stereology; Food safety.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada (BUCHANAN, 1993 ).....	6
<b>Figura 2 :</b> Velocidade relativa de diferentes reações de acordo com a atividade de água do alimento (adaptado de TSOTSAS e MUJUMDAR, 2011). .....	11
<b>Figura 3:</b> Fases do crescimento microbiano (NAKASHIMA et al., 2000). .....	13
<b>Figura 4:</b> Cultura de <i>Penicillium sp.</i> (adaptado de Imagens Micologia, Disponível em: <a href="http://www.microbiologia.vet.br/ImagensMicologia.htm">http://www.microbiologia.vet.br/ImagensMicologia.htm</a> , 2017). .....	14
<b>Figura 5:</b> Cinética de germinação e proliferação de esporos individuais de <i>Penicillium expansum</i> a 25°C monitorado em microscópio de contraste de fase (adaptado de GOUGOULI e KOUTSUMANIS, 2013). .....	14
<b>Figura 6:</b> Grade de pontos com interseção de linhas horizontais e verticais sobre o plano de corte da imagem (SALES, 2011). .....	19
<b>Figura 7:</b> Esquema que demonstra (a) fotografia tradicional, (b) utilizando linha teste e (c) grade de pontos (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). .....	21
<b>Figura 8:</b> Fração volumétrica recristalizada, $V_v$ , em função do tempo de reação para taxa de crescimento (ASSIS,2006). .....	22
<b>Figura 9:</b> Câmara de fotografia MEDALIGHT Digital Imaging box acoplada com Câmera Dome Infravermelho.....	24
<b>Figura 10:</b> Gravador digital de vídeo Intelbrás® .....	25
<b>Figura 11:</b> a: Cone de cartolina preta montado ao redor da placa de Petri; b: câmera de segurança envolvido pelo cone. ....	25
<b>Figura 12:</b> Janela da Barra de Ferramentas do programa ImageJ® .....	26
<b>Figura 13:</b> Abertura da Barra de Ferramentas do programa ImageJ® .....	26
<b>Figura 14:</b> a: Imagem aberta antes de aplicar a opção <i>Clear outside</i> ; b: Imagem após aplicação da opção <i>Clear outside</i> . .....	26
<b>Figura 15:</b> Processo de transformação da imagem para níveis de cinza (8-bit).....	27
<b>Figura 16:</b> a: Imagem sendo ajustada através da ferramenta <i>Threshold</i> ; b: Imagem obtida após aplicação do <i>Threshold</i> .....	27
<b>Figura 17:</b> a: Abertura da janela e seleção da ferramenta <i>Analyse&gt; Analyse Particles</i> ; b: Ajuste de parâmetros no <i>Analyse Particles</i> .....	28
<b>Figura 18:</b> Obtenção da imagem numerada pelo programa ImageJ® .....	28
<b>Figura 19:</b> Janela de resultados expressos em pixels fornecido pelo programa ImageJ® ..	28
<b>Figura 20:</b> Sequência de imagens do crescimento do fungo <i>Penicillium sp.</i> obtidas por 7 dias.....	30
<b>Figura 21:</b> Representação pelo modelo linear do crescimento do <i>Penicillium sp.</i> em meio BDA a 25°C.....	32
<b>Figura 22:</b> Gráfico da derivada discreta apresentando máximo de crescimento de 50 a 58 horas .....	33
<b>Figura 23:</b> Gráfico de Erro Padrão .....	33
<b>Figura 24:</b> Sobreposição das curvas de crescimento individuais das colônias do <i>Penicillium sp.</i> .....	34
<b>Figura 25:</b> Gráfico após ajuste de modelo matemático com aplicação de ajuste de coeficiente linear de 0 a 50 horas. ....	35
<b>Figura 26:</b> Gráfico após ajuste de modelo matemático com aplicação de ajuste de coeficiente linear de 52 a 168 horas. ....	35
<b>Figura 27:</b> Gráfico após ajuste de modelo matemático com aplicação de ajuste de coeficiente linear de 0 a 168 horas. ....	36

**Figura 28:** Representação pelo modelo linear do crescimento micelial de dois isolados de *Penicillium sclerotigenum* no meio de cultivo: BDA (adaptado de OLIVEIRA et al. 2006).  
..... 37

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>A</b>	-	Valor da assíntota inferior
<b>A<sub>A</sub></b>	-	Fração de área
<b>AI</b>	-	Análise de Imagem
<b>A<sub>w</sub></b>	-	Atividade de água
<b>APPCC</b>	-	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
<b>B</b>	-	Velocidade de crescimento relativa no tempo M
<b>BDA</b>	-	Batata Dextrose gar
<b>BPF</b>	-	Boas Práticas de Fabricação
<b>C</b>	-	Valor da assíntota superior
<b>EQ</b>	-	Estereologia Quantitativa
<b>L<sub>L</sub></b>	-	Fração Linear
<b>M</b>	-	Tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta  máxima
<b>N(t)</b>	-	Densidade da população no tempo
<b>N<sub>v</sub></b>	-	Número de Objetos por Unidade de Volume-Teste
<b>P<sub>A</sub></b>	-	Número de Pontos por Unidade de rea-Teste
<b>P<sub>P</sub></b>	-	Fração de Ponto
<b>POP</b>	-	Procedimento Operacional Padrão
<b>S<sub>v</sub></b>	-	rea Superficial por Unidade de Volume-Teste
<b>S<sub>VP</sub></b>	-	rea Superficial Específica
<b>T</b>	-	Tempo
<b>V<sub>v</sub></b>	-	Fração Volumétrica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1	Sistemas de Gestão da Segurança dos Alimentos	3
2.2	Microbiologia Preditiva	3
2.2.1	Histórico	4
2.2.2	Modelagem matemática	4
2.2.3	Validação dos métodos preditivos	9
2.3	Fatores que influenciam o crescimento microbiano	10
2.3.1	Fatores Intrínsecos	10
2.3.2	Fatores Extrínsecos	12
2.3.3	Relevância dos fatores de crescimento microbiano	12
2.4	Curva de crescimento microbiano	13
2.5	Aspectos Gerais do fungo <i>Penicillium sp.</i>	13
2.5.1	Impactos positivos e negativos do <i>Penicillium sp.</i> em alimentos	15
2.6	Utilização da Microbiologia Preditiva para crescimento de Fungos	15
2.7	Dificuldades na Utilização da Microbiologia Preditiva	16
2.8	Análise de Imagens na área biomédica	17
2.9	Estereologia Quantitativa	17
2.9.1	Grade de Pontos	18
2.9.2	Fração Volumétrica	19
2.9.3	Fração de Área	19
2.9.4	Fração de Pontos	19
2.9.5	Fração Linear	20
2.9.6	Área superficial por unidade de volume-teste	20
2.9.7	Breve histórico e utilização da estereologia quantitativa	20
2.9.8	Facilidades na utilização da estereologia	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
4.1	Aplicação de estereologia quantitativa para predição microbiológica	24
4.2	Preparo da amostra	24
4.3	Captura de imagens	24
4.4	Processamento das imagens com o uso do software ImageJ®	25
4.5	Análise das imagens para aplicação da estereologia	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
5.1	Obtenção e análise das imagens do <i>Penicillium sp.</i>	30
5.2	Análise estereológica e correlação com a Microbiologia Preditiva do <i>Penicillium sp.</i>	31
5.3	Construção experimental da curva de crescimento do <i>Penicillium sp.</i>	32
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>40</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Tanto a segurança quanto a qualidade de um alimento podem ser afetadas pela presença e possível proliferação de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes desde o início da produção ao consumo (VAN IMPE et al., 2005).

A busca por mecanismos na melhoria da qualidade das indústrias de alimentos está cada vez maior principalmente devido a mudança no comportamento do consumidor, que tem se tornado mais exigente e mais informado em relação aos produtos que consome, e assim, assumindo um importante papel de fiscalizador da qualidade e da segurança dos alimentos (TOLEDO et al., 2004).

Sendo assim, a avaliação microbiológica é um aspecto de extrema relevância para verificar a qualidade dos alimentos, fornecendo informações com relação às condições de processamento, armazenamento, distribuição, validade comercial e risco à saúde da população (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

A microbiologia preditiva descreve, de forma quantitativa, os efeitos das condições ambientais no crescimento e inativação microbiana, permitindo prever a resposta do crescimento microbiano frente a variações de fatores como exemplo temperatura, condições de armazenamento como concentrações de sais ou de inibidores, umidade, pH, entre outros. Analisando a validade comercial e desenvolvendo novos produtos e processos aliando ações na tomada de decisão (DANNENHAUER, 2010).

A utilização da microbiologia preditiva foi impulsionada pela preocupação em fornecer alimentos microbiologicamente seguros e estáveis, através do desenvolvimento de modelos matemáticos para predição microbiológica (TELEKEN et al., 2011). Esses modelos têm sido extensivamente usados pela indústria de alimentos americana e pelo Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para projetar, implantar e avaliar os planos de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPC) (JUNEJA, 2016).

Desta forma, a microbiologia preditiva, combina elementos de microbiologia, matemática, informática e estatística para fornecer informações sobre o comportamento de microrganismos nos alimentos (MCMEEKIN et al., 2006).

Para Siqueira (2015) uma das maiores limitações quanto ao uso da Microbiologia Preditiva é derivada dos modelos em si. Pois eles não permitem saber se o microrganismo em questão está mesmo presente no alimento, e quando estão, não permitem conhecer a densidade microbiana no início do processo. Diminuindo os níveis de confiança para quem analisa os resultados.

A estereologia é uma ferramenta que combina geometria e probabilidade, permitindo estimar alguns parâmetros quantitativos como: área, tamanho, volume, densidade e número de populações de um material sólido em amostras como seções planas, oferecendo uma maneira eficiente para estimar esses parâmetros por ser um método simples, com validade e aplicabilidade (ESTEVES, 2011; OLIVEIRA, 2013).

A estereologia quantitativa vem sendo utilizada na área de ciência e engenharia de materiais, por realizar uma análise quantitativa de imagens. E na área biomédica por

possibilita a quantificação de estruturas morfológicas, tornando-se um instrumento valioso para trabalhos experimentais (SILVA, 2007; LOPES-PAULO, 2002)

A aplicação mais comum da estereologia está relacionada com a análise de imagens obtidas de microscópios, tanto de luz como o eletrônico. Para isso, se faz necessário, que o órgão ou o tecido analisado seja homogêneo, ou seja, que apresente a mesma característica em todas as direções. Sendo assim esse método pode ser utilizado para qualquer estrutura em que seja possível um estudo morfométrico ( DEHOFF, 2000).

A preferência pelos procedimentos de medição utilizados pela estereologia, tanto com a contagem de elementos por medição manual quanto por medição automatizada, se deve a maior simplicidade, facilidade de medição, rapidez e menores desvios de medida associados ao método (SILVA, 2007).

Mediante o descrito, vê-se a possibilidade de aplicação da estereologia quantitativa, para a predição do crescimento microbiano, buscando por uma ferramenta facilitadora na utilização dos modelos matemáticos. E ainda, como uma alternativa para o controle do processo tecnológico que visa minimizar e reduzir o tempo de análise.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Sistemas de Gestão da Segurança dos Alimentos

Os alimentos atuam diretamente na qualidade de vida por serem responsáveis pela prevenção, manutenção e recuperação da saúde (AMSON et al., 2006). Para desempenhar seu papel adequadamente é necessário que o alimento seja inócuo/ seguro, ou seja, não atue como um veículo causador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (OLIVEIRA e BARATA, 2013).

Peretti et al. (2010) exemplificam algumas ferramentas principais utilizadas visando a segurança dos alimentos, são elas as Boas Práticas de Fabricação (BPF), incluindo os Procedimentos Operacionais - POP, e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC. Sendo que o sistema APPCC é indicado por órgãos de fiscalização que preconizam a prevenção dos riscos com relação à qualidade sanitária. O setor produtivo, utiliza as ferramentas de gestão de perigos tais como as BPF, incluindo o POP, como parte do controle de qualidade do processo de produção, buscando atender ao sistema APPCC.

A indústria alimentícia tem como objetivo a produção de alimentos seguros, de forma a prevenir a ocorrência de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados com patógenos (SAVOV e KOUZMANOV, 2014).

A Microbiologia Preditiva é uma das ferramentas que pode ser usada para a identificação dos pontos críticos de controle (na utilização do APPCC) possibilitando, através da avaliação das implicações para a segurança dos alimentos, no caso de perda no "controle" do processo, avaliando equivalências entre diferentes processos ou tomando decisões de análise de risco e gestão do risco (DUARTE, 2011).

### 2.2 Microbiologia Preditiva

No Brasil a microbiologia preditiva tem despertado o interesse no ramo alimentício, por visar a qualidade e a garantia da segurança microbiológica dos alimentos. Sua aplicação está baseada na teoria de que o efeito das propriedades físicas e químicas dos alimentos, bem como suas interações, podem ser previsto por meio de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos, considerando ainda, as condições de estocagem (NAKASHIMA et al 2000).

Para Arroyo-Lopez et al. (2014) os modelos de predição são uma das mais importantes ferramentas para aferir a segurança dos alimentos e avaliar o risco nos alimentos, pois através das curvas de crescimento o pesquisador poderá explicar como ocorre a proliferação de um microrganismo em determinado alimento, prever o tempo que esse alimento poderá permanecer na prateleira e maximizar esse tempo pela modificação das condições de estocagem, como a temperatura, e informar ao consumidor até quando será possível utilizar esse produto sem riscos.

Além de considerar que a resposta da população de microrganismos para fatores ambientais são reprodutíveis, a microbiologia preditiva prevê que com a caracterização dos ambientes em termos de fatores dominantes identificáveis é possível, a partir de observações anteriores, avaliar as respostas dos microrganismos em outros ambientes semelhantes (DOROTA, 2014).

Os modelos preditivos são classificados de acordo com o comportamento da população que descrevem. Assim, existem modelos de crescimento, de inativação (WHITING, 1995; McMEEKIN e ROSS, 2002) e de limites ou interface de crescimento (modelos cresce-não cresce) (McMEEKIN e ROSS, 2002).

Existem diferentes modelos matemáticos disponíveis para representar o crescimento microbiano, isso deve ser levado em consideração para a escolha do melhor modelo para um uso específico. A utilização de modelos simples que não comprometam a exatidão do ajuste é desejável (McDONALD e SUN, 1999). Eles são a base para a construção de modelos preditivos para condições ambientais dinâmicas.

### **2.2.1 Histórico**

O uso da microbiologia preditiva data de 1922, quando Esty e Meyer, descreveram os processos térmicos de inativação de *Clostridium botulinum* do tipo A, utilizando modelo linear descritivo do processo, que permitia relação entre taxa de mortalidade da bactéria por um tempo a uma determinada temperatura (BARANYI e ROBERTS, 1994).

A partir da década de 80 em decorrência de surtos de toxinfecções alimentares acentuou-se o interesse pela microbiologia, aumentando a necessidade da produção de alimentos seguros. A presença de microrganismos, como *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, fez com que os governos dos Estados Unidos da América, Reino Unido e outros países da União Europeia, priorizassem pesquisas relacionadas à segurança dos alimentos corroborando para o desenvolvimento da microbiologia preditiva (McMEEKIN et al., 2006).

Os modelos preditivos vêm sendo utilizados como ferramenta de investigação e avaliação dos processos de conservação de alimentos. Proporcionando um caminho rápido e relativamente econômico para se obter dados confiáveis de crescimento, inativação e sobrevivência no desenvolvimento microbiano. A microbiologia preditiva através de parâmetros como: velocidade máxima de crescimento, duração da fase lag e população microbiana máxima atingida, auxilia no desenvolvimento de novos produtos, na fase de produção, armazenamento e distribuição, avaliando, dessa forma, a validade comercial dos produtos alimentícios (SARMENTO, 2006).

O uso de modelos preditivos aumentou, devido à capacidade tecnológica atual de realizar medições em células individuais através da modelagem computacional, permitindo construir pontes entre a descrição de microrganismos a nível da célula e as observações macroscópicas ao nível da população, fornecendo um maior conhecimento sobre os fenômenos tanto em níveis unicelulares quanto populacionais (FERRER, 2009).

### **2.2.2 Modelagem matemática**

A classificação de modelos preditivos baseia-se na população de microrganismos, utilizando do seu comportamento para descrever e incluir os modelos e limites de crescimento (interface) e, ainda, os modelos de inativação (McMEEKIN et al., 2006).

Os modelos podem ser chamados de cinéticos, quando relacionam uma reposta através da medida no tempo, correlacionando as condições ambientais por expressões matemáticas (MILLER et al., 2004) ou de probabilístico, quando examinam a probabilidade de que um microrganismo responda crescendo, morrendo ou produzindo um

metabólito num dado período de tempo (McMEEKIN e ROSS, 2002; ROSS e McMEEKIN, 1994; WHITING, 1995).

Essas expressões matemáticas, ou, modelos preditivos se apresentam de três maneiras principais (SWINNEN et al., 2004):

- **modelo primário:** relaciona a resposta de um microrganismo em circunstâncias ambientais estáticas a um determinado tempo (parâmetros cinéticos), por exemplo uma câmara com temperatura fixa;

- **modelo secundário:** descreve a dependência dos parâmetros do modelo primário para as variações das condições ambientais, como por exemplo uma câmara simulando uma variação de temperatura em diversos pontos de um deslocamento;

- **modelo terciário:** resolve os modelos primário e secundário através de softwares ou soluções.

### 2.2.2.1 Modelo primário

Para Whiting e Buchanan (1997) o nível primário de modelos matemáticos correspondem a mudança do número de microrganismos em função do tempo. Podendo descrever a redução da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), a formação de toxinas microbianas ou outro metabólito.

A duração da fase lag, velocidade específica máxima de crescimento e aumento logarítmico da população são as principais respostas microbiológicas (FERREIRA, 2004). O modelo matemático mais utilizado para descrever essas curvas de crescimento é o de Gompertz, modificado por Gibson et al. (1987) (Equação 1)

$$\log N_{(t)} = A + C \exp \{- \exp [ -B ( t - M ) ]\} \quad \text{Eq. 01}$$

Em que:

t = tempo

N(t) = densidade da população no tempo

A = valor da assíntota inferior, isto é,  $\log N_{(-\infty)}$  (aproximadamente equivalente ao log do número inicial de bactérias)

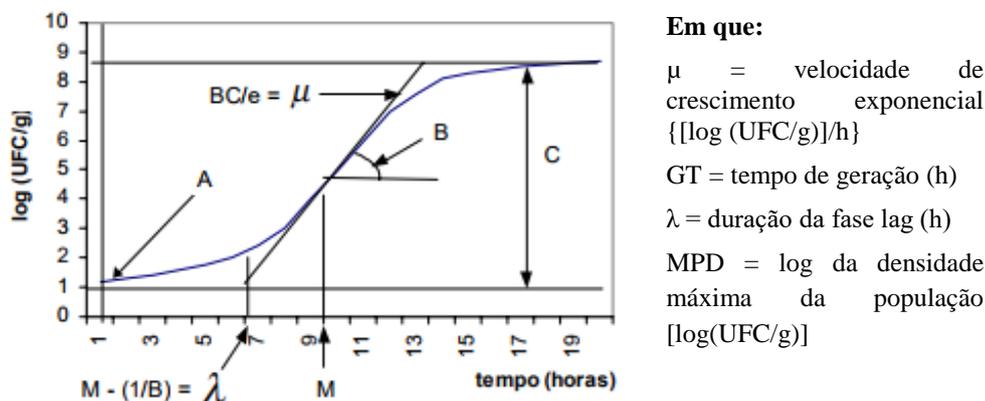
C = valor da assíntota superior, isto é,  $\log N_{(+\infty)}$  (aproximadamente equivalente ao log da densidade máxima da população durante a fase estacionária menos o log da contagem inicial)

M = tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima

B = velocidade de crescimento relativa no tempo M.

Acredita-se que as equações do modelo modificado de Gompertz descrevem satisfatoriamente dados do crescimento microbiano e assim, tem sido amplamente utilizado. Contudo, alguns estudos demonstraram desvios sistemáticos no ajuste de dados do desenvolvimento microbiano (LÓPEZ et al, 2004).

Os quatro parâmetros da equação podem prontamente ser relacionados matematicamente com características culturais familiares aos microbiologistas (Figura 1) (BUCHANAN, 1993).



**Figura 1:** Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada (BUCHANAN, 1993).

Teleken et al., (2011) desenvolveram um modelo matemático primário derivado da Função de Gompertz para prever o crescimento microbiano no leite. Observaram o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* e *Bacillus cereus* em produtos lácteos retirados do banco de dados *comBase*. O modelo desenvolvido apresentou concordância entre a teoria e a prática, tornando possível estimar os valores da taxa de crescimento máxima e a duração da fase lag, fornecendo informações biológicas sobre o comportamento dos microrganismos estudados.

No intuito de resolver as dúvidas sobre o modelo modificado de Gompertz, Baranyi e Roberts (1994) propuseram um outro modelo que oferece uma fase de crescimento exponencial linear,  $\mu_{(x)}$  e uma fase lag determinada por uma função de ajuste,  $\alpha_{(t)}$  (Equação 2).

$$\frac{dN}{dt} = \left[ \frac{Q(t)}{1 + Q(t)} \right] \cdot \mu_{max} \cdot \left[ 1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right] \cdot N(t) \quad \text{Eq.02}$$

Em que:

N = densidade celular (UFC/mL);

$\mu_{max}$  = taxa de crescimento específico máxima (1/h);

N<sub>max</sub> = densidade celular máxima (UFC/mL)

Q = 45 medida do estado fisiológico das células.

Kim et al (2018) investigaram o nível de microrganismos indicadores no repolho napa salgado, intimamente associados à sua qualidade, incluindo bactérias aeróbias totais, coliformes totais (CT) e bactérias de ácido láctico (BAL). Em diferentes temperaturas (5, 22 e 30 °C, por até 72 h); avaliando a relação entre variações de pH e contagens bacterianas durante o armazenamento; e desenvolvendo um modelo de crescimento preditivo a partir

do modelo modificado de Gompertz para determinar o prazo de validade. Observaram que os tamanhos populacionais permaneceram estáveis a 5 °C, mas rapidamente aumentada de 12 h a 22 e 30 °C e o pH mostrou correlação negativa com todos os grupos bacterianos e não impediu o crescimento de CT durante o armazenamento. Concluindo que o período de aceitabilidade microbiológica do repolho napa salgado foi estimado em 12,6 e 9,3 h a 22 e 30 °C, respectivamente. Assim, os consumidores devem usar o produto dentro de 12 horas de armazenamento à temperatura ambiente

### 2.2.2.2 Modelo secundário

Os parâmetros ambientais determinados pela cinética de crescimento microbiológica (aumento da população de microrganismos com o tempo), estão relacionadas com condições de estocagem (fatores extrínsecos) e com as características do produto (fatores intrínsecos) (SARMENTO, 2006).

O modelo secundário dispõe de equações que referem-se às respostas dos modelos primários (duração da fase lag, velocidade de crescimento e densidade máxima de população) podendo sofrer modificações de acordo com os parâmetros ambientais (McMEEKIN et al., 1993, SKINNER et al., 1994).

Os fatores ambientais de maior relevância são: pH, temperatura, atividade de água ( $a_w$ ), concentração de agentes antimicrobianos, entre outros. Dentre esses, a temperatura é o fator mais relevante, uma vez que a velocidade específica máxima de crescimento e a fase lag são altamente dependentes da temperatura (GIANNUZZI et al., 1998).

A equação de Arrhenius (Eq. 03), considera que a velocidade de crescimento é controlada pela velocidade limite de uma única reação enzimática.

$$\ln k = \ln A - Ea/RT \quad \text{Eq.03}$$

Em que:

k = velocidade de crescimento

A = parâmetro a ser ajustado

Ea = energia de ativação da reação que limita a velocidade de crescimento, ou simplesmente a temperatura característica

R = constante universal dos gases (8.314 J / K mol)

T = temperatura em Kelvin

O modelo de Bélerádek (Eq.04) baseia-se na relação linear que existe entre a raiz quadrada da velocidade de crescimento abaixo da velocidade de crescimento ótima e a temperatura.

$$\sqrt{k} = b (T - T_{min}) \quad \text{Eq. 04}$$

Em que:

k = velocidade de crescimento

b = parâmetro a ser estimado

T = temperatura de interesse (temperaturas subótimas)

T<sub>mín</sub> = temperatura mínima em que a velocidade de crescimento extrapolada é zero

Ding et al., (2012) desenvolveram modelos preditivos secundários avaliando o efeito combinado da temperatura (15, 25 e 35 °C) e umidade relativa (60%, 70% e 80%) no crescimento de *Escherichia coli* O157: H7 em couve. Os modelos desenvolvidos mostraram uma boa concordância entre os valores observados e previstos.

### 2.2.2.3 Modelo terciário

Os modelos terciários são ferramentas desenvolvidas em que rotinas dos *softwares* computacionais correlacionam as informações dos modelos primários e secundários permitindo a determinação das curvas de crescimento microbiano (WHITING, 1995).

Há um grande número de *softwares* de acesso livre na internet que fornecem previsões de taxa de crescimento ou o crescimento microbiano com o intervalo de tempo definido sob determinadas condições (McMEEKIN e ROSS, 2002).

Dentre os *softwares* comerciais, que podem ser adquiridos livres de encargos eles estão:

- **ComBase:** sua base de dados conta com 24.000 gravações de curvas de crescimento e sobrevivência de microrganismos, que abrangem os deteriorantes, taxas de crescimento/morte e os patogênicos. Por exemplo os microrganismos que podem ser citados são *Bacillus cereus* (esporos e células vegetativas), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *innocua*, *Staphylococcus aureus*, etc.  
**Desenvolvido por:** USDA Agricultural Research Service (USDA-ARS) and the University of Tasmania Food Safety Centre.  
**Disponível em:** <http://www.combase.cc/>
- **Pathogen Modeling Program:** prevê curvas de crescimento de bactérias a valores definidos de temperatura, pH e concentração de NaCl (ou atividade de água). Utilizando o modelo de Gompertz modificado, prevendo o crescimento dos seguintes microrganismos: *Aeromonas hydrophila*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica*.  
**Desenvolvido por:** USDA Agricultural Research Service (USDA-ARS)  
**Disponível em:** <http://www.lfra.co.uk/micromodel/index.html>
- **Seafood Spoilage Predictor (SSP):** desenvolvido para prever a validade comercial de alimentos marinhos estocados à temperatura constante ou sob alterações de temperatura.  
**Desenvolvido por:** Paw Dalgaard, professor in Predictive Food Microbiology Division of Industrial Food Research, National Food Institute, Technical University of Denmark.  
**Disponível em:** <http://dfu.min.dk/micro/ssp/>
- **Food Product Modeller:** utilizado para monitorar produtos modelados ou congelados em diferentes condições.

**Desenvolvido por:** Agresearch MIRINZ Centre under contract to Meat New Zealand e Meat e Livestock Australia.

**Disponível em:** <http://www.agresearch.co.nz>

Anastácio (2009) exemplificou a utilização do programa **ComBase** simulando o efeito da variação do teor de sal no crescimento de *Staphylococcus aureus* em um produto com pH de 4.5, em duas temperaturas (10 e 20°C). Com os gráficos adquiridos observou que os diferentes níveis de sal (0, 0.5, 1 e 1.5%) apresentaram poucas diferenças de crescimento entre si, sendo a temperatura mais significativa para o aumento do perigo do crescimento.

Silva et al. (2009) utilizaram o **Pathogen Modeling Program (PMP)** para verificar o crescimento de *Salmonella enterica* subs. *enterica* sorovar *Typhimurium* a 25°C em alimentações entéricas formuladas industrialmente e em hospital, obtiveram resultados que foram utilizados para validar o modelo matemático de Crescimento de *Salmonella* apresentado pelo (PMP) 7.0 (USDA-EUA).

Dalgaard et al. (2002) utilizaram o **Seafood Spoilage Predictor (SSP)** para descrever o desenvolvimento e distribuição em modelos de deterioração de frutos do mar, relatando a eficiência do software na detecção de modelos matemáticos para estimar a validade comercial desses produtos servindo para estimular o uso da microbiologia preditiva, salientando a necessidade de expansão do programa para novos produtos e modelos, como por exemplo, a preservação de mariscos

### 2.2.3 Validação dos métodos preditivos

A etapa de validação ocorre após o ajuste do modelo aos dados experimentais, para verificar se o modelo está de acordo com os dados experimentais (MCCLURE et al., 1994; ROSS, 1996).

A validação de modelos preditivos é fundamental para garantir os níveis de confiança dos mesmos. O entendimento do significado das incoerências existentes nas possíveis predições feitas pelos modelos é dada pela validação (McELROY et al., 2000).

Segundo McElroy (2000), a qualidade dos modelos preditivos é avaliado através dos cálculos dos fatores: bias ( Equação 5) e de exatidão ( Equação 6).

$$bias = 10\left(\frac{\sum \log\left(\frac{predito}{observado}\right)}{n}\right) \quad \text{Eq. 05}$$

$$exatidão = 10\left(\frac{\sum |\log predito/observado|}{n}\right) \quad \text{Eq.06}$$

O fator bias indica se a média dos valores observados se encontra acima ou abaixo da linha de equivalência. Em outras palavras, coloca o mesmo peso na média dos valores que superestimam e subestimam a média, entre os valores observados e preditos (ROSS,1996).

O fator de exatidão calcula a média da distância entre cada ponto e a linha de equivalência como uma medida do quão próximas da média as predições estão das observações. Ele é especialmente útil em casos de comparação entre modelos que tem outros parâmetros de validação semelhantes (ROSS,1996).

## 2.3 Fatores que influenciam o crescimento microbiano

A combinação de fatores extrínsecos (relacionados ao ambiente) e intrínsecos (relacionados ao alimento) pode servir como obstáculo ao ataque dos microrganismos, às alterações químicas e físicas, originando o conceito dos obstáculos de Leistner. O sinergismo destes fatores melhora a estabilidade, e conseqüentemente, a qualidade do alimento, tornando-o inócuo à saúde do consumidor (CASTRO et al., 2008, FRANCO e LANDGRAF, 2004).

### 2.3.1 Fatores Intrínsecos

#### 2.3.1.1 pH

A concentração hidrogeniônica do alimento (pH) é um fator de importância na limitação das espécies de microrganismos capazes de se desenvolver, exercendo influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição destes microrganismos (SILVA, 2000).

O crescimento da grande maioria dos microrganismos ocorre na faixa de pH em torno de 7,0 (6,6-7,5), apesar de fungos, filamentosos, leveduras e bactérias lácticas crescerem em pH < 4,0. Para os alimentos o pH 4,6 é o marco para segurança alimentar, pois abaixo dele não há crescimento de *Clostridium botulinum* (BOARD, 1988).

O pH em torno da neutralidade (6,5 – 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos, alguns, como as bactérias preferem o meio ácido, devido a inibição da microbiota de competição (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

O efeito inibidor do pH é dependente do tipo de ácido presente no alimento e dos nutrientes, atividade de água ( $A_a$ ), temperatura e pressão parcial de  $O_2$  (MASSAGUER, 2005).

#### 2.4.1.2 Atividade de água ( $A_a$ )

A água é encontrada de forma livre ou ligada no alimento. A água livre encontra-se disponível para reações químicas e crescimento microbiano, agindo ainda, como solvente para sais e açúcares. Enquanto a água ligada, está associada com outros grupos químicos, como grupos hidrofílicos de polissacarídeos e proteínas, sendo indisponibilizada para reações químicas e microbiológicas (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2007) A necessidade de água dos microrganismos para realizarem suas atividades metabólicas está relacionado com a atividade de água ( $A_a$ ), água livre nos alimentos. E esse parâmetro é definido na equação 7 (JAY, 2005):

$$A_a = \frac{P}{P_0} \quad \text{Eq.07}$$

Em que :

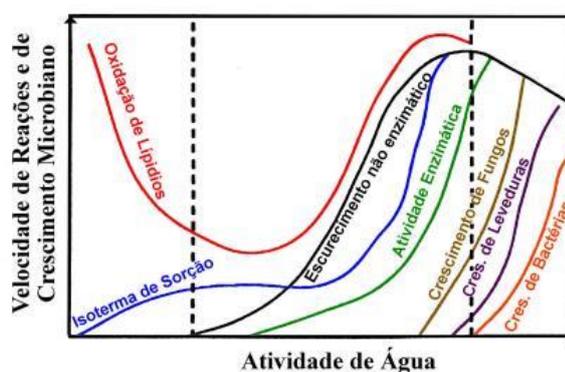
P= pressão de vapor da solução

$P_0$ =pressão de vapor do solvente (normalmente água pura).

Cada microrganismo necessita de uma  $A_a$  mínima para o crescimento.

A maioria das bactérias deteriorantes não cresce com  $A_a$  menor que 0,91, já as patógenas não se desenvolvem em  $A_a$  menor que 0,86, enquanto o *Clostridium botulinum* não se desenvolve em  $A_a$  abaixo de 0,94. Os fungos xerofílicos e leveduras osmofílicas, conhecidos por se desenvolver em ambientes com baixa disponibilidade de água, geralmente não se desenvolvem em  $A_a$  entre 0,65-0,61 (JAY, 2005).

A  $A_a$  não só influencia o crescimento microbiano, mas também determina a estabilidade dos alimentos, demonstrando ser um importante parâmetro para reações: enzimáticas, oxidativas, hidrolíticas e de escurecimento (Figura 2), afetando a estabilidade nutricional, a coloração, o odor, o sabor e a textura dos alimentos (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2007).



**Figura 2 :** Velocidade relativa de diferentes reações de acordo com a atividade de água do alimento (adaptado de TSOTSAS e MUJUMDAR, 2011).

Ao contrário do crescimento microbiano, as reações químicas e enzimáticas podem ocorrer em  $A_a$  muito baixas. As reações de escurecimento enzimático e não enzimático ocorrem acima de um valor crítico de  $A_a$  e atingem a velocidade máxima em um valor de  $A_a$  intermediário, com diminuição nos altos valores (ESKIN e ROBINSON, 2000).

Tsotsas e Mujumar (2011) demonstram no gráfico expresso na Figura 2, que a oxidação lipídica tende a aumentar na faixa de  $A_a$  de 0,25 a 0,8, as reações de Maillard e a hidrolítica aumentam na faixa de  $A_a$  de 0,2 a 0,8, enquanto as reações enzimáticas acontecem a partir de 0,4.

### 2.3.1.2 Potencial oxi- redução (O/R, Eh)

O potencial oxi-redução (O/R, Eh) está relacionado com a perda e o ganho de elétrons de certos substratos. O elemento que perde elétron é dito oxidado e o elemento que ganha elétron é dito reduzido. Sendo assim quanto mais oxidado for o elemento maior será seu Eh (mais positivo), e quanto mais reduzido for o elemento menor será seu Eh (mais negativo).

O Eh depende do grau de oxidação e do pH do próprio alimento e também da circulação de outras substâncias oxidantes e redutoras (MASSAGUER, 2005).

De acordo com Hoffmann (2001) o valor de Eh influencia na multiplicação microbiana determinando o quanto de oxigênio eles necessitam. Podendo ser classificados nos seguintes grupos:

- aeróbios (+500 a +300mV);

- anaeróbios (+100 a -250mV);
- anaeróbios facultativos (+300 a -100mV)

## 2.3.2 Fatores Extrínsecos

### 2.3.2.1 Temperatura

A temperatura é o principal fator extrínseco responsável pelas reações de deterioração dos alimentos, pois os parâmetros cinéticos de crescimento microbiano são altamente dependentes dela. Como citado por Massaguer (2005), resfriar os alimentos entre 0 e 10°C é uma medida importante para controlar a proliferação de microrganismos, contudo, a temperatura não os elimina, apenas torna o processo mais lento, pois alguns microrganismos, como bactérias psicrófilas, são capazes de se multiplicar a baixas temperaturas.

A temperatura de armazenamento dos alimentos está envolvida com o crescimento e viabilidade dos microrganismos. De acordo com sua temperatura ótima de crescimento, os microrganismos classificam-se em: termófilos (45-90°C), mesófilos (20-40°C), psicrófilos (15-20°C) psicrófilas (0-20°C) (BOARD, 1988; MOYER e MORITA, 2007).

### 2.3.2.2 Umidade relativa do ambiente

Existe uma correlação entre a atividade de água ( $A_a$ ) e a umidade relativa de equilíbrio do ambiente. Quando o alimento está em equilíbrio com o ambiente a umidade relativa (UR) é igual  $A_a \times 100$  (FRANCO e LANDGRAF, 2004). Desta forma, o gradiente entre a umidade relativa do ambiente e a atividade de água do produto determina a absorção ou a perda de umidade deste alimento (AZEREDO et al., 2012).

A migração de umidade é uma das principais causas de alterações causadoras de deterioração em alimentos. Isso pode ser observado em produtos frescos, que perdem a umidade tornando-se murchos, e em produtos secos, que perdem a crocância por absorção de umidade (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

## 2.3.3 Relevância dos fatores de crescimento microbiano

Augustin et al. (2005) verificaram a taxa e a probabilidade de crescimento de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos, cárneos e em frutos do mar em condições sub-ótimas por modelos preditivos, utilizando os seguintes fatores para o crescimento: temperatura, pH, ácido presente no meio, a atividade da água, a concentração de nitrito de sódio, a concentração de fenol, e da proporção CO<sub>2</sub> na atmosfera modificada, constatando que o uso do modelo foi eficiente na detecção do patógeno *Listeria monocytogenes* nos alimentos avaliados.

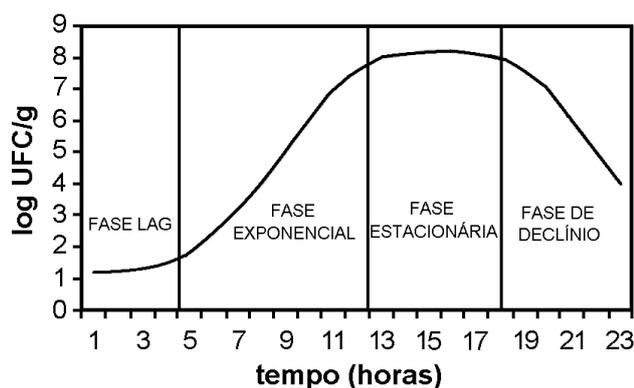
Wang et al. (2012) avaliaram o efeito da umidade relativa e da temperatura sobre o comportamento de *Escherichia coli* O 157: H7 em alface. Por meio da utilização do modelo logístico, foi possível verificar que variações na temperatura foram mais influentes no crescimento de *E. coli* O 157: H7 do que as mudanças ambientais de umidade.

Baranyi et al. (2014) propuseram um modelo (secundário), em que a atividade de água e a temperatura são usadas como variáveis, para o logaritmo natural das taxas de crescimento do modelo primário. Permitindo estimar os erros experimentais e ambientais

do modelo, contribuindo para o erro total de previsão. E assim, utilizar este método para diminuir erros de modelos preditivos.

## 2.4 Curva de crescimento microbiano

O crescimento de microrganismos ocorre em quatro fases distintas conforme demonstrado na Figura 3, em que a fase lag corresponde à adaptação do microrganismo ao meio, a fase exponencial, refere-se à reprodução do microrganismo que se encontra adaptado ao ambiente, a fase estacionária, corresponde ao decréscimo de nutrientes e a taxa de reprodução é equivalente à taxa de mortes e a fase de declínio, na qual os microrganismos produzem toxinas e o número de mortes supera o número de novos microrganismos (ROBAZZA e TELEKEN, 2010).



**Figura 3:** Fases do crescimento microbiano (NAKASHIMA et al., 2000).

O período de duração da fase *lag* pode ser relacionada com a validade comercial dos alimentos, uma vez que após o período de adaptação do microrganismo este desenvolve a capacidade de crescer exponencialmente e, em um tempo reduzido, é capaz de reduzir a estabilidade e deteriorar o alimento. Por isso, a estimativa da duração da fase *lag* tem recebido muita importância na literatura de microbiologia preditiva (LONGHI, 2012).

Nakashima (2000) destaca que para os microbiologistas de alimentos, as fases de maior importância são a fase lag e a exponencial, visto que a deterioração dos alimentos ocorre antes de chegar à fase estacionária.

Os modelos matemáticos têm por função representar essa curva de crescimento, em uma ou mais fases, utilizando equações, que possuem uma parte determinística, que representa as variáveis e cujo comportamento é esperado, e uma parte estocástica, que pode ou não existir no modelo e cujo comportamento é aleatório e desconhecido (DANNENHAUER, 2010).

## 2.5 Aspectos Gerais do fungo *Penicillium sp.*

O fungo *Penicillium sp.*, possui colônias de crescimento rápido, com tons variando de verde ou branco (Figura 4), em sua maioria composta por uma densa camada de conidióforos.

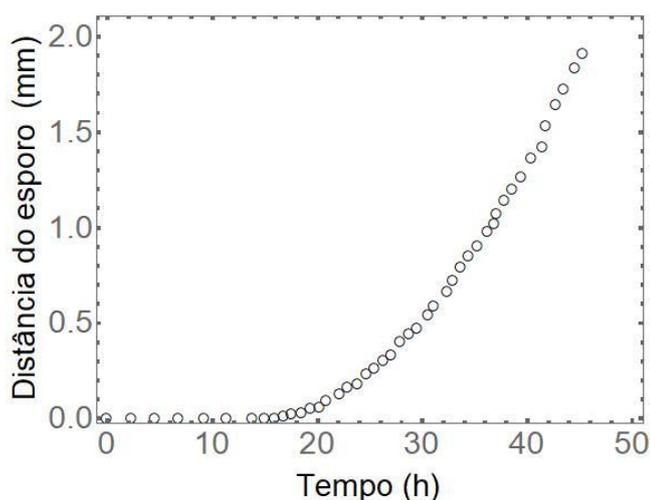


**Figura 4:** Cultura de *Penicillium sp.* (adaptado de Imagens Micologia, Disponível em: <http://www.microbiologia.vet.br/ImagensMicologia.htm>, 2017).

O gênero *Penicillium sp.* foi classificado ao Reino Fungi como pertencente ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycete, ordem Eurotialesse pertencentes à família Trichocomanaceae. (MYCOLOGY ONLINE, 2016)

O *Penicillium sp.* se reproduz de forma assexuada em forma de conídios, que se desenvolvem em micélios septados. Sua reprodução é dada por esporulação, em que os corpos de frutificação sintetizam por mitose células abundantes e leves, que são disseminadas pelo meio. Dessa maneira, o esporo denominado conídio, possui a capacidade de dar origem a um novo fungo filamentososo ao cair em material apropriado. (PELCZAR, 1997).

A deterioração de alimentos por fungos envolve dois fenômenos: germinação do esporo (fase exponencial) seguida de proliferação do micélio (fase linear), como apresentado na Figura 5 (GOUGOULI e KOUTSUMANIS, 2013).



**Figura 5:** Cinética de germinação e proliferação de esporos individuais de *Penicillium expansum* a 25°C monitorado em microscópio de contraste de fase (adaptado de GOUGOULI e KOUTSUMANIS, 2013).

### 2.5.1 Impactos positivos e negativos do *Penicillium sp.* em alimentos

Sabe-se que a presença de fungos ocasiona alterações tanto no sabor quanto na qualidade dos alimentos. Algumas destas alterações são desejáveis, como na fabricação de queijos. Entretanto, em alguns casos, os fungos podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis, causados por diferentes graus de deterioração (DINIZ, 2002).

Além disso, alguns fungos que se desenvolvem em alimentos são produtores de micotoxinas e antibióticos (PETSKA, 1995), e a presença de compostos segregados pelo fungo nos alimentos tem sido relatada em diferentes ocasiões (LÓPEZ-DIAZ, 1996).

As micotoxinas são metabólitos secundários. Os metabólitos primários são àqueles essenciais ao crescimento do fungo, enquanto os secundários são formados no final da fase exponencial de crescimento e parece não ter relação direta com seu crescimento e metabolismo (JAY, 2005). A ingestão de micotoxinas é capaz de causar sérios transtornos no organismo do homem e dos animais. Provocando danos à saúde, são produzidas em condições favoráveis e representam relevante perigo ao ser humano (SABINO, 1996).

Existem alguns fungos pertencentes ao gênero *Penicillium sp.*, que causam alterações desejáveis nos alimentos, pois crescem em produtos de carne curados e em vários tipos de queijo. Sendo utilizados como iniciadores, como um meio para colonizar homoganeamente o queijo ou pedaço de carne, evitando assim a eventual colonização por fungos e bactérias indesejáveis. As espécies de fungos mais utilizadas para maturação de carne e queijo são: *Penicillium nalgiovense* e *Penicillium chrysogenum* para produtos à base de carne, *Penicillium roqueforti* para o queijo Roquefort e *Penicillium camemberti* para o queijo Camembert (CASTRO et al., 2000).

Laich et al. (1999) mostraram que *P. nalgiovense* produz penicilina na superfície de uma salsicha fermentada espanhola (fuet), a presença do antibiótico pode ser detectada nas camadas externas das salsichas.

A presença de penicilina nos alimentos é indesejável, pois pode produzir reações alérgicas e, eventualmente, pode levar ao desenvolvimento de fenômenos de resistência em bactérias residentes humanas, que poderiam então transferir essa informação genética para bactérias patogênicas, como a transferência de genes de resistência entre bactérias no cólon humano demonstrou ser um fenômeno comum (MACAROV et al., 2012)

### 2.6 Utilização da Microbiologia Preditiva para crescimento de Fungos

Segundo Baranyi et al. (1996), o uso dos modelos preditivos, largamente aceito no estudo do crescimento bacteriano, tem se mostrado uma importante ferramenta no estudo do crescimento de fungos. Mas a modelagem preditiva do crescimento de fungos filamentosos não tem recebido grande atenção como o crescimento bacteriano, provavelmente devido à complexidade de se quantificar o seu crescimento.

Nos últimos anos houve um crescente interesse em estudos de modelagem do comportamento dos fungos em alimentos abordando qualidade e segurança de alimentos, através da importância na previsão da deterioração por fungos, evitando grandes perdas econômicas e também a produção e contaminação por micotoxinas (DANTIGNY e PANAGOU, 2013.).

Hajjaj et al. (2000) apontam sobre a importância dos fungos filamentosos devido sua influência no ecossistema, e no estilo de vida dos seres humanos, participando da produção de alimentos e produtos de saúde, e na reciclagem de compostos orgânicos na biosfera. São usados em muitos processos industriais como na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, polióis, pigmentos, lipídios e glicolipídios. Alguns destes são comercializados, enquanto outros são potencialmente valiosos em biotecnologia (ADRIO e ARNOLD, 2003).

Erkmen e Alben (2002) estimaram a produção de ácido cítrico e formação de biomassa em cultura submersa usando *Aspergillus niger* de semolina subdimensionada, com e sem metanol, foram analisados usando os modelos de Gompertz, Logística Schnute e Boltzman. Eles foram comparados estatisticamente usando o teste F. Modelos de três parâmetros foram estatisticamente suficientes para descrever a formação de ácido cítrico e biomassa de *A. niger*. As taxas de formação de ácido cítrico e biomassa variaram de 0,099 a 0,412 g/l / dia e 0,173 a 0,744 no dia 1, respectivamente. A fase lag de duração aumentou de 0,387 para 3,281 e 0,087 para 0,824 dias, respectivamente. A maior concentração de metanol e pH inicial tiveram efeitos significativos na formação de ácido cítrico e biomassa

Cuppers et al. (1997) modelaram o crescimento de fungos em um meio de cultura sólido a várias temperaturas e concentrações de NaCl usando cinco moldes de deterioração de alimentos comuns (*Penicillium roqueforti*, *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus niger* e *Emericella nidulans*). Para a descrição da taxa de crescimento (expressa como o aumento de diâmetro da colônia por unidade de tempo) em função da temperatura e concentração de NaCl, um modelo de seis parâmetros foi desenvolvido. O modelo combina a dependência de temperatura do tipo Ross ou do tipo Ratkowsky com a dependência da concentração de NaCl derivada da relação entre a taxa de crescimento e a Atividade de Água, como proposto por Gibson e colaboradores. Com intuito de o modelo ser útil para microbiologistas de alimentos cujo objetivo seja prever a probabilidade de deterioração dos fungos.

Molina e Giannuzzi (1999) utilizaram o modelo de Arrhenius para avaliar o efeito da temperatura e da concentração de ácido propiônico no crescimento de *Aspergillus parasiticus*. Uma relação linear entre a fase lag e a taxa de crescimento em diferentes concentrações de ácido propiônico foram avaliadas por análise de regressão linear. O comportamento dos fungos foi modelado considerando os principais e uma metodologia de superfície de resposta foi estabelecida em termos de ácido propiônico e temperatura. Concluíram que o modelo proposto poderia ser utilizado na microbiologia de alimentos para prever o crescimento de fungos toxicogênicos.

## **2.7 Dificuldades na Utilização da Microbiologia Preditiva**

A microbiologia preditiva envolve o uso de equações não lineares e diferenciais, tornando o trabalho por vezes dispendioso, exigindo tempo e atenção, considerando que, pequenas variações em um dos parâmetros provoca uma grande mudança no valor final da função. Além disso, essas equações não possuem solução analítica e para encontrar as constantes que melhor se ajustem a um conjunto de dados coletados, em cada um dos modelos existentes, é necessário recorrer a métodos numéricos e computacionais, por vezes inacessíveis aos pesquisadores fora da área de exatas (SWINNEN et al., 2004).

A necessidade de conhecimento prévio para realização da interpretação dos resultados e obtenção de parâmetros cinéticos superestimados, encontram-se entre as

limitações envolvidas neste tipo de estudo. Além disso, grande parte dos estudos são realizados em meios formulados no laboratório e que não consideram a interação entre microrganismos, estrutura e composição quando determinados na matriz do alimento (BLACKBURN, 2000).

A escolha e a utilização dos modelos preditivos devem ser realizadas com cuidado, considerando as limitações descritas. É relevante saber para quais microrganismos em específico foram desenvolvidos e quais fatores foram testados e considerados para aquele modelo. Neste sentido, o usuário deve estar ciente de que o uso para situações não simuladas poderá gerar respostas que não refletem a realidade (FAKRUDDIN et al., 2011).

## **2.8 Análise de Imagens na área biomédica**

Com o avanço da tecnologia nas últimas décadas, a informática tem sido uma boa ferramenta na área das ciências biomédicas desencadeando, uma revolução. Sendo assim, as ferramentas digitais tornaram-se componentes imprescindíveis ao ensino, aos laboratórios (de pesquisa ou de diagnóstico), clínicas e hospitais (MELO-JÚNIOR et al., 2006).

Nesse contexto, a análise digital de imagens (AI) tem se mostrado inovadora no quesito de armazenagem, discriminação e estudo estatístico de dados numéricos de uma imagem. Os *softwares* especializados em AI possuem a capacidade em apresentar gráficos complexos, avaliar padrões de cor e distinguir imagens, e com isso, tem sido amplamente utilizados nas análises morfométricas de padrões histológicos e citológicos (HAMILTON, 1997; LAMBERT et al., 2001).

Existem sistemas especializados em utilizar técnicas de computação gráfica, gratuitos disponíveis no mercado, com recursos que aumentam a sensibilidade e fornecem informações mais precisas para o processamento de imagens, auxiliando no diagnóstico por imagem (SANTOS, 2009).

Para extrair dados numéricos de uma imagem, é necessário que a análise quantitativa possua uma ferramenta eficiente capaz de transformar em números, as características dos elementos que formam a imagem. Frequentemente, esta ferramenta está relacionada a um software de análise de imagens, podendo ser livre (por exemplo, ImageJ, STEPanizer), ou ainda, comercial (por exemplo, novo CAST, Visiopharm, Hoersholm) também pode ser usado (DIAS, 2008, RICHE, 2012).

A criação de métodos para o processamento de imagens permite a extração de mais informações por excluir, delimitar e realçar algumas características obtidas pela imagem digital. As imagens digitais são representadas por uma matriz cujos elementos são chamados *pixels* (*picture elements*) simbolizando a unidade fundamental de análise de uma figura através de tonalidades específicas de cor (LAMBERT et al., 2001). Desse modo, pode-se extrair da imagem alguns atributos relevantes, como por exemplo: contagem de objetos, determinação de forma, medidas lineares, estereologia (conjunto de métodos de quantificação de estruturas morfológicas) (LOPES-PAULO, 2002).

## **2.9 Estereologia Quantitativa**

A estereologia é o ramo da ciência que estuda as relações geométricas entre uma estrutura tridimensional e as imagens dessas estruturas que são bidimensionais (RUSS; DEHOFF, 2000). Permite a caracterização de uma estrutura tridimensional usando uma

ferramenta que consiga transformar os aspectos em duas dimensões nos aspectos tridimensionais reais de interesse, representando apenas uma das fases de análise de imagens. As características estruturais que podem ser determinadas pela estereologia são:

- volumes de certos elementos estruturais (frações de fases presentes);
- áreas de elementos superficiais planos ou não;
- comprimentos de elementos lineares, nível de vizinhança entre fases presentes em uma estrutura (contigüidade) e tamanhos de elementos volumétricos (RUSS e DEHOFF, 2000).

A estereologia quantitativa (EQ) consiste na fundamentação de procedimentos que possibilitam através do uso da geometria e da probabilidade a análise de uma imagem plana, por medição e contagem de elementos de uma imagem tridimensional. (SILVA, 2007; FILHO, 2009).

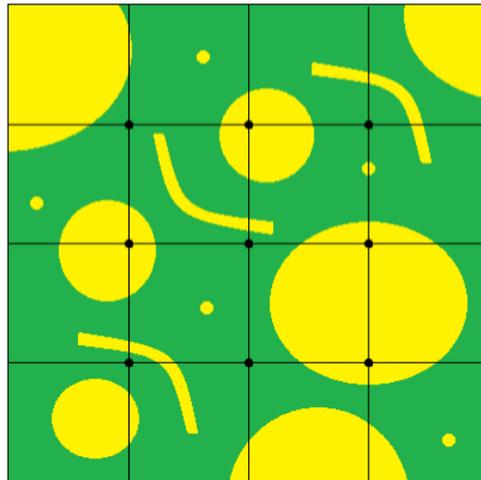
Através da utilização dessa técnica é possível observar características relevantes, tais como: Fração Volumétrica e área de interface da imagem analisada, tamanhos de elemento volumétrico, nível de vizinhança (contigüidade) (ESTEVEVES, 2011).

A composição de uma estrutura opaca, em volume, pode ser determinada por contagem de pontos, de comprimento de interseção de linhas ou pela área dos elementos. Quando se utiliza o método de seções de corte, pode-se utilizar da contagem de pontos, o qual, desenhando-se uma rede de pontos sobre o plano; contam-se os pontos que coincidem com a fase matriz e aqueles que coincidem com a fase dispersa (UNDERWOOD, 1970).

### **2.9.1 Grade de Pontos**

Para realização de medições e cálculos da imagem de interesse é necessário a sobreposição de uma malha de pontos, ou grade de pontos sobre o plano de corte da imagem que se deseja avaliar. Pode-se formar a malha de pontos com interseção de linhas horizontais e verticais sobre o plano de corte da imagem (Figura 6). E, assim será possível viabilizar a aplicação da EQ (UNDERWOOD, 1970).

A grade de pontos normalmente é retangular e possui área conhecida, e em seu interior há um número de pontos e segmentos predeterminados para contagem da imagem à qual será sobreposta, de acordo com a Figura 6 (LOPES- PAULO, 2002).



**Figura 6:** Grade de pontos com interseção de linhas horizontais e verticais sobre o plano de corte da imagem (SALES, 2011).

### 2.9.2 Fração Volumétrica

Na EQ a Fração Volumétrica ( $V_v$ ) pode ser determinada de três maneiras distintas, são elas a fração de área ( $A_A$ ), fração de pontos ( $P_P$ ) e a fração linear ( $L_L$ ), de acordo com a igualdade da equação 8. Os parâmetros utilizados para determinar o valor da  $V_v$  são baseados na contagem da área das seções, pontos ou comprimento dos interceptos lineares e a relação entre elas está demonstrada na equação 8 (RUSS; DEHOFF, 2000; SILVA, 2007).

$$V_v = A_A = P_P = L_L \quad \text{Eq.08}$$

Lopes-Paulo (2002) propôs o valor da  $V_v$  em seu trabalho através da razão entre o número de pontos da grade sobre o elemento em estudo (corte histológico da parede colônica) e o número total de pontos da grade.

### 2.9.3 Fração de Área

A fração de área ( $A_A$ ) é determinada pela razão entre o somatório das áreas de seções do plano de corte com a área total, conforme demonstrado na equação 9 (RUSS; DEHOFF, 2000; SILVA, 2007).

A Fração Volumétrica ( $V_v$ ) também pode ser estimada utilizando-se a  $A_A$ , conforme observado na equação 10:

$$A_A = \frac{\sum \text{Áreas seções}}{\text{Área Total}} \quad \text{Eq.09}$$

$$(V_v) = (A_A) \quad \text{Eq. 10}$$

### 2.9.4 Fração de Pontos

A fração de pontos ( $P_P$ ) é dada pelo somatório dos pontos incidentes na interseção de linhas horizontais com verticais na grade de pontos, dividido pelo total de pontos da

grade, de acordo com a equação 11. A equação 12 demonstra a obtenção da  $V_V$  através da fração de pontos ( $P_P$ ) (RUSS; DEHOFF, 2000; SILVA, 2007).

$$P_P = \frac{\sum \text{Pontos Incidentes}}{\text{Total de Pontos}} \quad \text{Eq.11}$$

$$(V_V) = (P_P) \quad \text{Eq.12}$$

### 2.9.5 Fração Linear

A determinação da fração linear ( $L_L$ ) é obtida pelo comprimento individual da área de interesse (fases, poros e etc) que é dividido pelo comprimento total da linha teste, conforme a equação 13 (PADILHA, 2007; SALES, 2014).

$$L_L = \frac{\sum \text{Interceptos Lineares}}{\text{Comprimento Total Linhas}} \quad \text{Eq.13}$$

A Fração Volumétrica ( $V_V$ ) também pode ser estimada utilizando-se a  $L_L$ , conforme observado na equação 14:

$$(V_V) = (L_L) \quad \text{Eq.14}$$

### 2.9.6 Área superficial por unidade de volume-teste

A área superficial por unidade de volume-teste ( $S_V$ ) é calculada de acordo com a equação 15, em que PL representa o número de pontos (intersecções) gerados quando aplicamos na microestrutura uma linha teste de comprimento unitário L (PADILHA, 2007)

$$S_V = 2 PL \quad \text{Eq.15}$$

### 2.9.7 Breve histórico e utilização da estereologia quantitativa

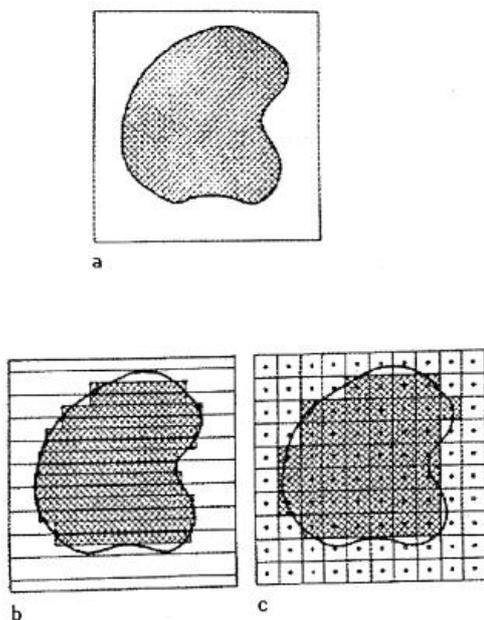
A Sociedade Internacional para Estereologia foi fundada em 1961, na Alemanha e contava com pesquisadores que trabalhavam com aplicação e desenvolvimento de métodos estereológicos em diferentes campos da ciência. A Sociedade representava quatro campos da ciência: anatomia, biologia, matemática e medicina, bem como três países: EUA, República Federal da Alemanha e Noruega (GADEK-MOSZCZAK, 2017).

A idéia de interdisciplinaridade foi tão bem sucedida, que hoje em dia é possível encontrar trabalhos nas mais diversas áreas, das quais podemos citar: medicina, medicina veterinária, biologia, metalurgia, engenharia de materiais como os principais interessados.

A quantificação de elementos estruturais nas fotografias de microscopia eletrônica é fundamental nos estudos experimentais e anátomo-patológicos. A estereologia, também chamada por alguns de morfometria é um conjunto de métodos de quantificação de estruturas morfológicas que permite quantificar numericamente as mais variadas estruturas, macro ou microscópicas, constituindo-se em instrumento valioso na avaliação de resultados de trabalhos experimentais (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995; LOPES-PAULO, 2002).

Na área biológica a estereologia se aplica para estimar: densidade de volume ( $V_V$ ), densidade de comprimento ( $L_V$ ), densidade de superfície ( $S_V$ ), densidade numérica ( $N_V$ ), densidade de área ( $A_A$ ) e densidade numérica por área ( $N_A$  ou  $Q_A$ ), para tanto, utiliza-se de

linhas teste ou grade de pontos de área conhecida conforme a Figura 7 (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).



**Figura 7:** Esquema que demonstra (a) fotografia tradicional, (b) utilizando linha teste e (c) grade de pontos (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

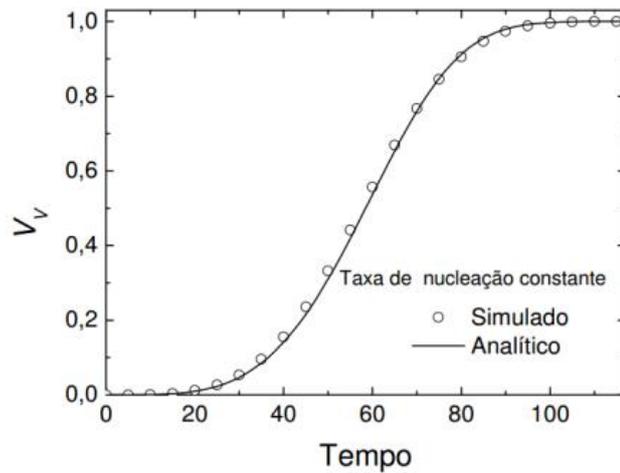
Amenábar et al. (2003) utilizaram a estereologia como método na pesquisa histológica de glândulas salivares e através do uso de uma rede de pontos sobre a imagem demonstrou sua aplicação na análise de imagens. Eles concluíram que a estereologia quando bem utilizada, é uma ótima ferramenta permitindo a obtenção de dados estatísticos seguros.

Técnicas estereológicas de primeira e segunda ordem foram utilizadas por Noorafshan, Niazi et al. (2016) na pesquisa de cartilagem femoral de ratos para obter dados quantitativos (volume, área superficial, comprimento), visto que métodos tradicionais como medição morfométrica não fornecem dados completos para esse tecido e verificaram a eficiência da técnica.

Dige et al. (2009) desenvolveram e avaliaram o método estereológico para quantificação de bactéria em biofilmes dentais intactos e concluíram que a estereologia é uma ferramenta confiável para obtenção de dados numéricos de populações bacterianas.

Vê-se pelos exemplos a gama de aplicações da estereologia, abrindo novas possibilidades de utilização, inclusive como ferramenta para microbiologia preditiva.

Assis (2006), investigou o efeito da nucleação, da velocidade de crescimento e da distribuição da energia armazenada na recristalização de metal pelo método autômato celular em três dimensões, para tanto a cinética de recristalização tem sido analisada freqüentemente com auxílio da teoria. A Figura 8 ilustra a medida da fração volumétrica em função do tempo para recristalização do grão.



**Figura 8:** Fração volumétrica recristalizada,  $V_v$ , em função do tempo de reação para taxa de crescimento (ASSIS,2006).

### 2.9.8 Facilidades na utilização da estereologia

A medição de EQ pode ser realizada de três maneiras principais: manual, semi-automática e automática. A manual é realizada pelo operador, a automática utiliza programas de computador que realizam o procedimento de medida, extraindo os dados estereológicos (contagem, comprimento e área) da imagem analisada. A semi-automática utiliza-se da forma manual e automática. A escolha do método deve ser respeitada para uma melhor precisão dos resultados, (DA SILVA, 2007).

A EQ como método quantitativo, apresenta vantagens sobre os estudos qualitativos, uma vez que os resultados são numéricos, sendo, portanto, reprodutíveis em qualquer laboratório. Permite facilmente, a comparação entre diversos grupos (por exemplo: idade, espécie, resposta a determinadas substâncias). Outra característica interessante, é que os pesquisadores envolvidos necessitam de um tempo menor de treinamento, quando comparado à outro método. Além disso, a EQ possui seu método probabilístico bem como suas bases matemáticas teóricas bem estabelecidos, o que garante um respaldo a esta ferramenta (MANDARIM-DELACERDA, 2003).

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Utilizar medições estereológicas como uma ferramenta para a microbiologia preditiva, visando possibilitar a previsão do crescimento microbiológico nos alimentos de forma a garantir a segurança dos alimentos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Correlacionar a estereologia quantitativa com a microbiologia preditiva;
- Adequar uma técnica para captura de imagens sequenciais do desenvolvimento microbiano;
- Aplicar medições estereológicas no crescimento do microrganismo teste;
- Adequar um modelo matemático para prever crescimento microbiano com a utilização de softwares livres disponíveis.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório Agroindustrial de Embalagens e Tecnologia (LAETec) e no Núcleo de Modelamento Microestrutural, na Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta Redonda (EEIMVR), Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda-RJ.

### 4.1 Aplicação de estereologia quantitativa para predição microbiológica

Realizando consultas em livros, artigos e periódicos foi feita uma contextualização dos dois temas abordados, estereologia quantitativa e microbiologia preditiva, e então realizou-se a aplicação das medidas estereológicas na microbiologia.

### 4.2 Preparo da amostra

Foi utilizado o fungo *Penicillium sp.* mantido como cultura estoque em meio batata dextrose ágar (BDA), sob refrigeração o qual é repicado de três em três meses para garantir a vitalidade e quantidade de células viáveis do microrganismo. Com o auxílio de uma alça de platina foi feita uma raspagem de conídios da cultura do fungo, em seguida procedeu-se à transferência para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico, usando a lente de aumento 40X para obter a concentração de  $10^8$  conídios, e então, partindo dessa solução, procedeu-se à inoculação com o auxílio de uma pipeta Pasteur sendo colocado uma gota na parte central e cinco na lateral da placa de Petri contendo BDA. A placa foi acomodada dentro de uma câmara para fotografia, modelo MEDALIGHT Digital Imaging box, e esta acondicionada em câmara climatizada BOD a 25°C, este sistema foi mantido durante 7 dias.

### 4.3 Captura de imagens

À câmara para fotografia, foi previamente acoplado uma Câmera Dome Infravermelho modelo VMD 1010 Intelbrás®, equipada com 1/4" 1 megapi+D1+B3:D24+B3:D25, resolução de 1280 (H) X 720 (V) pixels efetivos e alcance de 10 metros (Figura 9), para obtenção da filmagem acompanhando o desenvolvimento do fungo.



**Figura 9:** Câmara de fotografia MEDALIGHT Digital Imaging box acoplada com Câmera Dome Infravermelho

A filmagem foi armazenada em um Gravador digital de vídeo Intelbrás<sup>®</sup>, modelo HDCVI 1008 ( Figura 10), permitindo backup das filmagens no formato AVI de duas em duas horas. As filmagens foram convertidas em fotos através de corte pelo programa Paint<sup>®</sup> e salvas no formato JPEG para posterior manipulação no período de 168 horas (7 dias), obtendo-se um total de 84 imagens.



**Figura 10:** Gravador digital de vídeo Intelbrás<sup>®</sup>

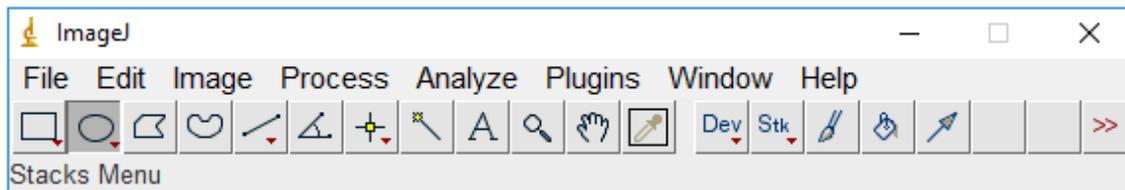
Para evitar o aparecimento de sombras na placa durante a filmagem, em decorrência da tampa de vidro da placa de Petri, foi ajustado ao sistema um cone preto colado com fita crepe ao redor da câmara (Figura 11a e 11b). A remoção da tampa implica no ressecamento do meio de cultura, inviabilizando o crescimento do microrganismo.



**Figura 11:** a: Cone de cartolina preta montado ao redor da placa de Petri; b: câmera de segurança envolvido pelo cone.

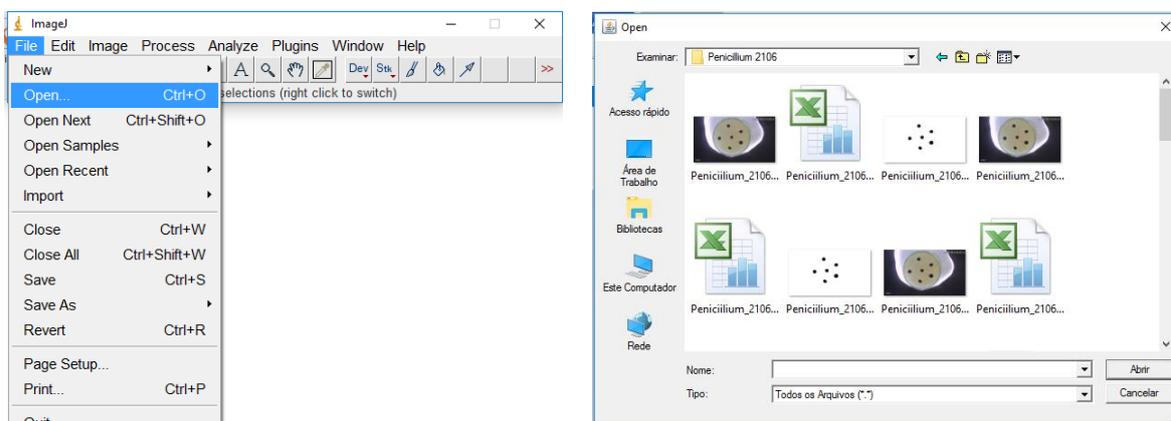
#### 4.4 Processamento das imagens com o uso do software ImageJ<sup>®</sup>

Nesse trabalho utilizou-se o software ImageJ<sup>®</sup> que foi obtido gratuitamente no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Esse software é utilizado para análise de imagens, fotos e vídeos. Possui ferramentas que podem ter utilidade em diversas áreas de conhecimento. A análise da imagem iniciou-se com a abertura do programa, aparecendo uma janela de barra de ferramentas, possibilitando encontrar a imagem ou vídeo a ser trabalhado (Figura 12).



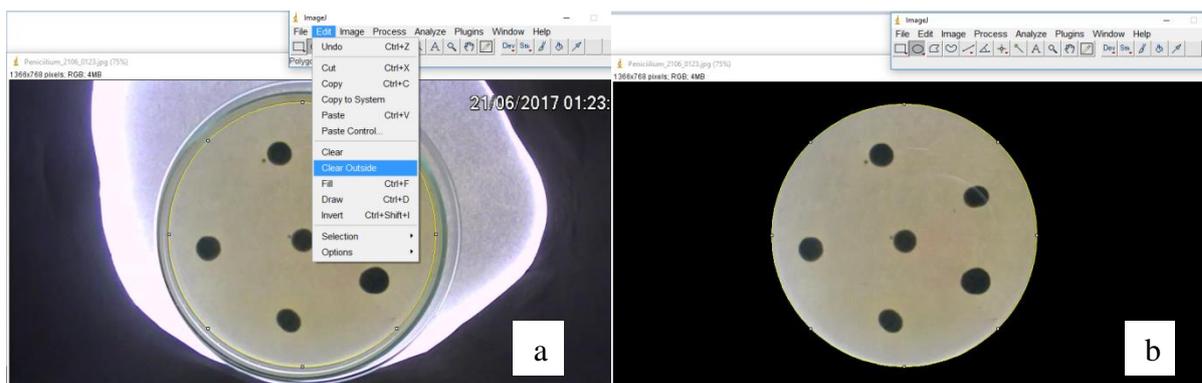
**Figura 12:** Janela da Barra de Ferramentas do programa ImageJ®

Para abrir a imagem seguiu-se a seguinte ordem *File > Open* procurou-se a pasta onde a imagem se encontrava, seleccionou-se para então iniciar os ajustes (Figura 13).



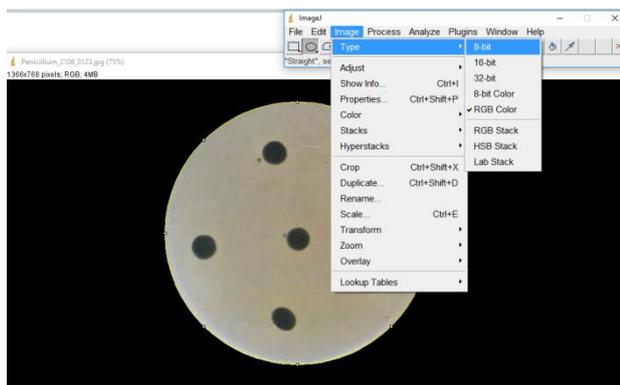
**Figura 13:** Abertura da Barra de Ferramentas do programa ImageJ®

Em seguida utilizou-se as opções *Seleção em círculo > Edit > Clear outside* para seleccionar e cortar a imagem onde foi realizada a contagem dos pontos de crescimento do *Penicillium sp.* (Figura 14a e 14b).



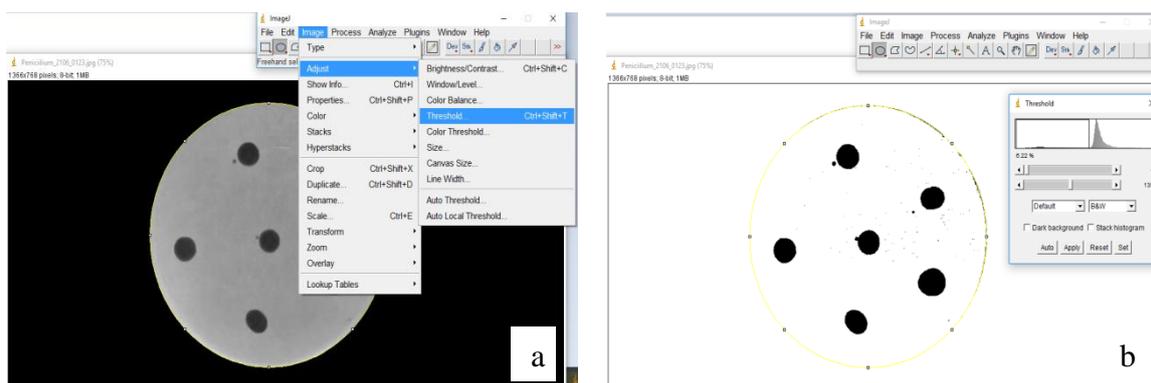
**Figura 14:** a: Imagem aberta antes de aplicar a opção *Clear outside*; b: Imagem após aplicação da opção *Clear outside*.

O ImageJ® atua na imagem pela intensidade do nível de cinza dos pixels, para isso foi necessário transformar a imagem para 8 bits obedecendo os seguintes comandos: *Image > Type > 8-bit* (Figura 15).



**Figura 15:** Processo de transformação da imagem para níveis de cinza (8-bit)

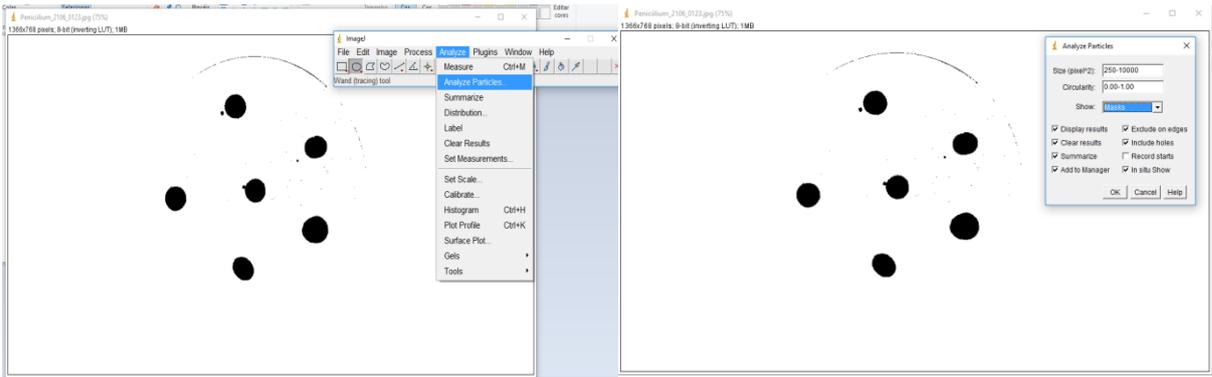
Afim de possibilitar a análise da imagem foi necessário realizar uma etapa de segmentação para obter a forma binária dessa imagem, com os pontos de interesse para contagem seguindo os passos: *Image> Adjust> Threshold* e na escala de níveis de preto e branco variando de 0-255 marcou-se 1 na primeira janela, obtendo um fundo branco e 135 na segunda janela demarcando os pontos de crescimento do fungo, por último confirmou-se no botão de comando *Apply* (Figura 16a e 16b).



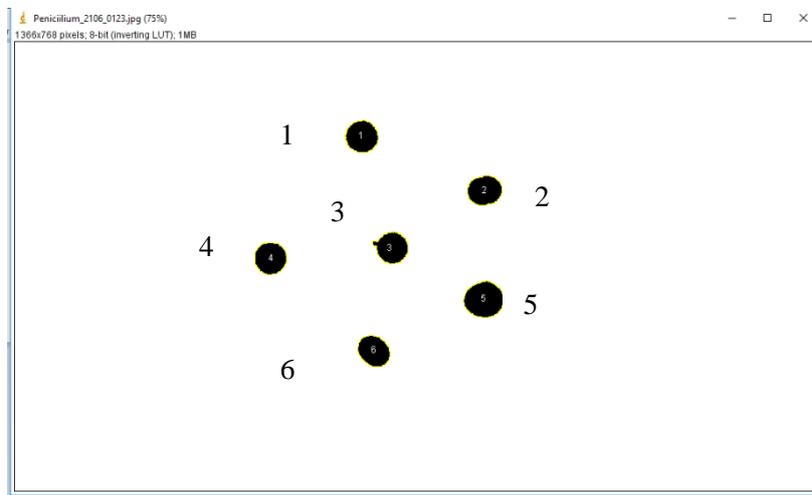
**Figura 16:** a: Imagem sendo ajustada através da ferramenta *Threshold*; b: Imagem obtida após aplicação do *Threshold*

A partir da imagem binária, selecionou-se a função *Analyze> Analyze Particles* análise com ajustes de parâmetros (Figura 17a e 17b). O resultado foi um desenho onde cada colônia foi identificada com um número (Figura 18), obedecendo-se o mesmo padrão de numeração para todas as contagens realizadas pelo ImageJ®.

Obteve-se a área ocupada por cada colônia e após contagem por todas, através da contagem dos pixels em cada uma das regiões identificadas (Figura 19).



**Figura 17:** a: Abertura da janela e seleção da ferramenta *Analyze* > *Analyze Particles*; b: Ajuste de parâmetros no *Analyze Particles*



**Figura 18:** Obtenção da imagem numerada pelo programa ImageJ®

Slice	Count	Total Area	Average
Penicillium_2106_0123.jpg	6	14957	2492.8

Label	Area	Mean	Mode	Min	Max	Perim.	Major	Minor	Ang
3	2315.000	255	255	255	255	199.360	55.762	52.859	161.
4	2379.000	255	255	255	255	185.823	55.360	54.715	91.9
5	3258.000	255	255	255	255	215.137	67.794	61.189	4.69
6	2259.000	255	255	255	255	177.924	59.573	48.281	138.
7 Mean	2492.833	255	255	255	255	191.416	58.974	53.658	94.8
8 SD	377.850	0	0	0	0	13.656	4.732	4.438	71.7
9 Min	2259.000	255	255	255	255	177.924	55.360	48.281	4.69
10 Max	3258.000	255	255	255	255	215.137	67.794	61.189	161.

**Figura 19:** Janela de resultados expressos em pixels fornecido pelo programa ImageJ®

#### 4.5 Análise das imagens para aplicação da estereologia

À partir da obtenção da área total e individual ocupada pelas colônias do fungo *Penicillium sp.* na placa de Petri, resultado fornecido pelo software livre ImageJ<sup>®</sup> em formato de planilha, realizou-se a compilação dos dados no programa Excel<sup>®</sup> para posterior aplicação da Estereologia Quantitativa.

O modelo matemático utilizado foi escolhido baseando-se nos parâmetros de crescimento microbiano em função do tempo. Os cálculos de medida estereológica para determinação da fração volumétrica ( $V_V$ ), como uma forma de apresentar o perfil da cinética de crescimento do *Penicillium sp.* foi dada de acordo com a equação 16, em que  $V_V$  foi determinado através da razão entre a área das colônias do *Penicillium sp.* ocupadas ( $A_A$ ) pela área total da maior colônia ( $A_T$ ).

$$V_V = \frac{\sum A_A}{\sum A_T} \quad \text{Eq. 16}$$

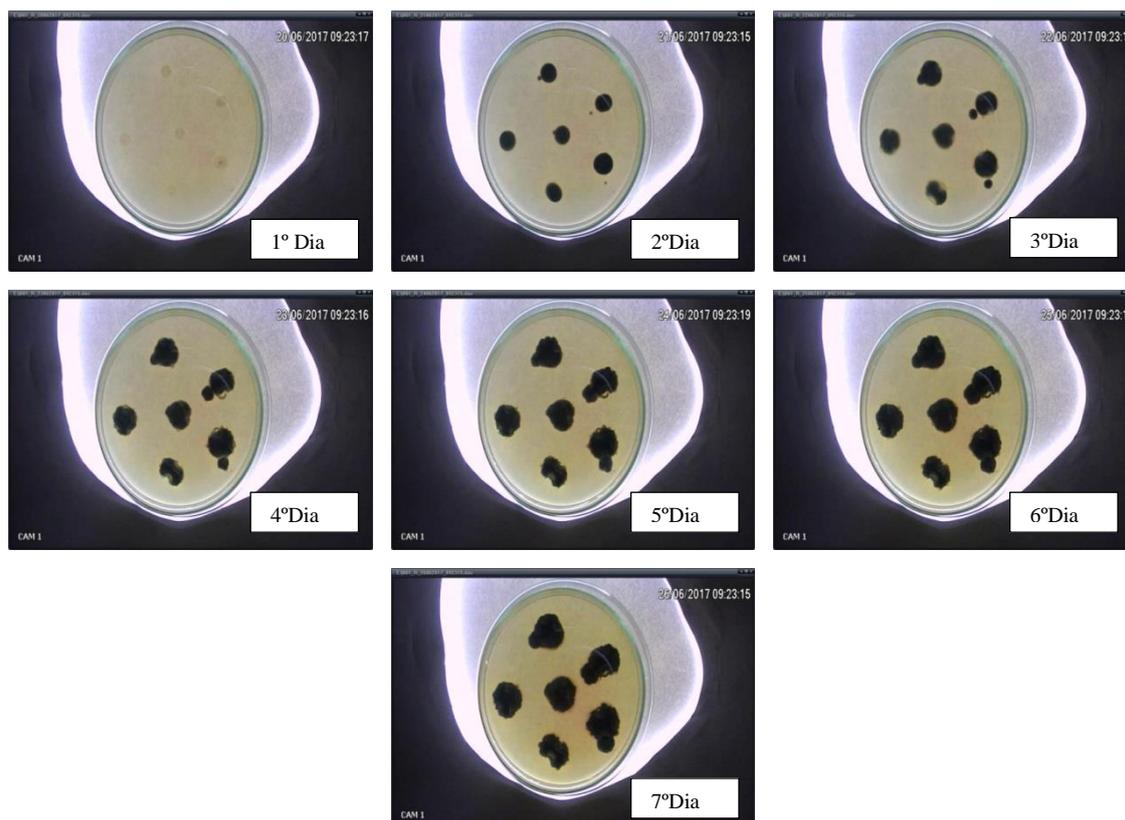
Após a obtenção da fração volumétrica no programa Excel<sup>®</sup>, procedeu-se à elaboração dos gráficos através do software Mathematica<sup>®</sup>. Por fim foi utilizado um ajuste do modelo matemático através do Excel<sup>®</sup>. Todos os computadores e softwares necessários e utilizados durante o experimento se encontram na Universidade Federal Fluminense.

A correlação entre a estereologia quantitativa e a microbiologia preditiva é dada uma vez que o modelo matemático (primário), prevê o desenvolvimento do fungo em função do tempo, e o modelo terciário resolve o modelo primário através do uso de softwares.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e análise das imagens do *Penicillium sp.*

A partir da inoculação de 6 gotas da solução de água peptonada com *Penicillium sp.*, originou-se o crescimento de 6 colônias, às quais foram observadas individualmente e integralmente. Assim sendo, a adequação da técnica de captura de imagens sequencial proporcionou o estudo da cinética de crescimento microbiano durante 7 dias ( Figura 20).



**Figura 20:** Sequência de imagens do crescimento do fungo *Penicillium sp.* obtidas por 7 dias

Utilizando a ferramenta ImageJ<sup>®</sup>, foi obtido a área total e individual em pixels de crescimento do *Penicillium sp.* durante os sete dias (168 horas) de observação, com análise de 84 imagens no total.

Hannickel et al. (2002) realizaram a medição de partículas de magnetita obtidas por três rotas diferentes (química, biológica e física) através do processamento e análise de imagens digitais com o ImageJ<sup>®</sup>. Estas rotas produziram partículas em três tamanhos distintos de uma escala nanométrica: nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPION) com 10 nm, cristais de magnetita em cadeia presentes no citoplasma de bactérias magnetotáticas com 100 nm e partículas de magnetita moída encontradas no pigmento de tintas comerciais com 1000 nm. Obtiveram a distribuição de tamanho dos três tipos de partículas de magnetita nas amostras. Concluíram que o software ImageJ mostrou-se uma ferramenta de fácil utilização e eficaz na obtenção de medidas das diferentes partículas estudadas. Nesse trabalho o ImageJ<sup>®</sup> também mostrou-se uma boa ferramenta para quantificar e prever o crescimento do *Penicillium sp.*

Santana (2006) realizou a quantificação celular da área ulcerosa de tecidos a partir do software livre ImageJ<sup>®</sup>. Este autor, mostrou que houve o que chamou de “erro médio”, mas concluiu que esse erro apresentado pela contagem da área através do programa, não apresenta diferença estatística significativa, o que torna sua utilização segura e eficaz.

Logo após às análises de imagem procedeu-se ao tratamento dos dados pelo uso da estereologia.

## 5.2 Análise estereológica e correlação com a Microbiologia Preditiva do *Penicillium sp.*

Foi investigado por meio dos parâmetros estereológicos a Fração Volumétrica ( $V_v$ ) do *Penicillium sp.* em crescimento na placa de Petri. Assim, determinou-se a ocupação relativa da área individual das colônias pela área total de imagens ocupadas pelas colônias (baseando-se na maior colônia obtida) estudadas, já que a lei básica da estereologia é de que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável a quantidade de volume desta estrutura na área-teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

Desta forma, a Fração Volumétrica ( $V_v$ ) foi calculada conforme descrito na equação 16 do item 4.5, verificando-se correlação com o modelo primário da microbiologia preditiva. Posto que o crescimento do *Penicillium sp.* foi estimado em função do tempo, como rege o modelo citado. Percebe-se também correlação com o modelo terciário, uma vez que os resultados da área total e individual foram dadas pelo tratamento das imagens realizadas no software ImageJ<sup>®</sup>, e nesse modelo o crescimento microbiano é dado pelo uso de softwares computacionais.

Sendo que, o  $V_v$  do resultado total (somatório das 6 colônias) foi obtido dividindo-se a área total do *Penicillium sp.* em cada tempo pela média da área total de todas as colônias. Enquanto que o  $V_v$  das áreas individuais foi obtido dividindo-se a área individual do *Penicillium sp.* pela área total da colônia maior. As colônias foram organizadas pelo software ImageJ<sup>®</sup> em :A1, A2, A3, A4, A5 e A6, conforme explicitado na figura 18, em cada tempo pela média total de todas as áreas.

Pereira et al (1998) utilizaram-se de técnicas estereológicas para determinar o volume de miócitos ( $V_v[m]$ ) e, ainda a densidade de volume do interstício cardíaco ( $V_v[int]$ ) de ratos hipertensos e controle no período de 25 e 40 dias. Comprovando que o valor de ( $V_v[m]$ ) não apresentou diferença aos 25 dias, mas diminuiu 12,6% aos 40 dias, enquanto ( $V_v[int]$ ) não apresentou diferença aos 25 dias, mas aumentou 14,8% aos 40 dias.

Nesse trabalho a  $V_v$  também foi utilizada com intuito de estimar a cinética de crescimento do *Penicillium sp.*, permitindo a aplicação das medições estereológicas para prever tal fato.

Gomes (2011) determinou o volume médio dos hepatócitos ( $V_N$ ) do fígado de ratos desnutridos e submetidos à renutrição protéica. Constatando que o ( $V_N$ ) dos animais desnutridos diminuíram 44,86% em relação ao seu controle e os animais renutridos comparados ao controle diminuíram em 19,93%.

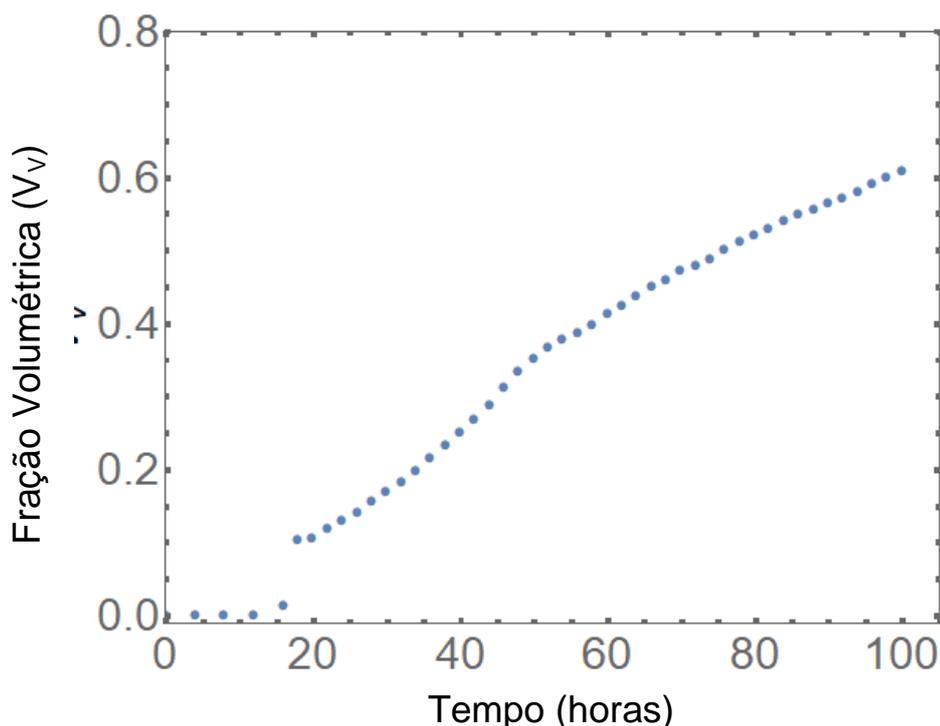
A hiperplasia endometrial é difícil de ser diagnosticada devido a controvérsias sobre os critérios histológicos. Contudo, utilizando microscopia óptica e estereologia, foi possível estudar as glândulas (epitélio e luz) e o estroma, determinando-se as densidades de

volume, de superfície e de comprimento. Os resultados adquiridos favoreceram estudos prévios que demonstraram a importância de parâmetros quantitativos no diagnóstico das doenças do endométrio, oferecendo novos parâmetros estereológicos para esta análise (AVVAD-PORTARIL et al., 2003).

A EQ vem sendo utilizada em diversas áreas, apresentando-se como uma boa ferramenta para os pesquisadores que optam por ela, neste trabalho a medição estereológica também mostrou-se eficaz para a obtenção da curva de crescimento fúngico.

### 5.3 Construção experimental da curva de crescimento do *Penicillium sp.*

A curva de crescimento experimental, baseada na área total do *Penicillium sp.*, está apresentada na figura 21 demonstrando que o inóculo do fungo, apresentou taxa de adaptação de 0 a 15 horas, iniciando o crescimento em 16 horas, e o máximo de crescimento entre 50 e 58 horas, de acordo com o cálculo discreto da derivada (Figura 22), e taxa de crescimento constante nos outros tempos de observação. Sendo assim, até o período de 7 dias após a inoculação, não observou-se decréscimo exponencial. Segundo Koch (1975) a Unidade Formadora de Colônia (UFC) bacteriana aumenta exponencialmente e quando transformada para log (UFC) do crescimento bacteriano, relacionando-se com o tempo representado pela curva de crescimento sigmoidal, com ou sem assíntotas superior (fase estacionária) e inferior (fase lag). No entanto, os moldes não são unicelulares; e os fungos formam micélio cujo peso, exceto no estágio inicial de crescimento, não aumenta exponencialmente.

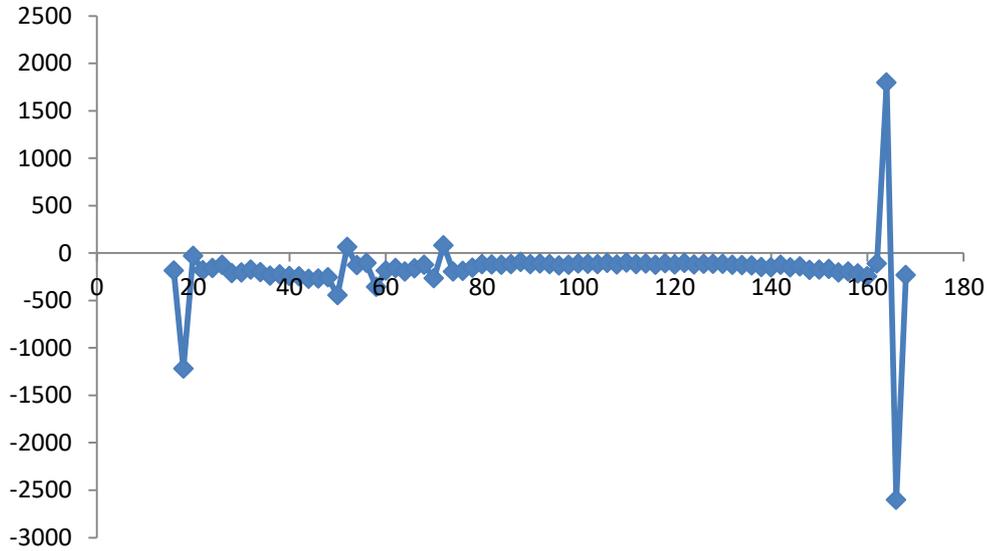


**Figura 21:** Representação pelo modelo linear do crescimento do *Penicillium sp.* em meio BDA a 25°C.

Sabe-se que o processo de deterioração dos alimentos, decorrente da multiplicação de microrganismos ocorre durante as fases lag e exponencial. Diante disso, metodologia

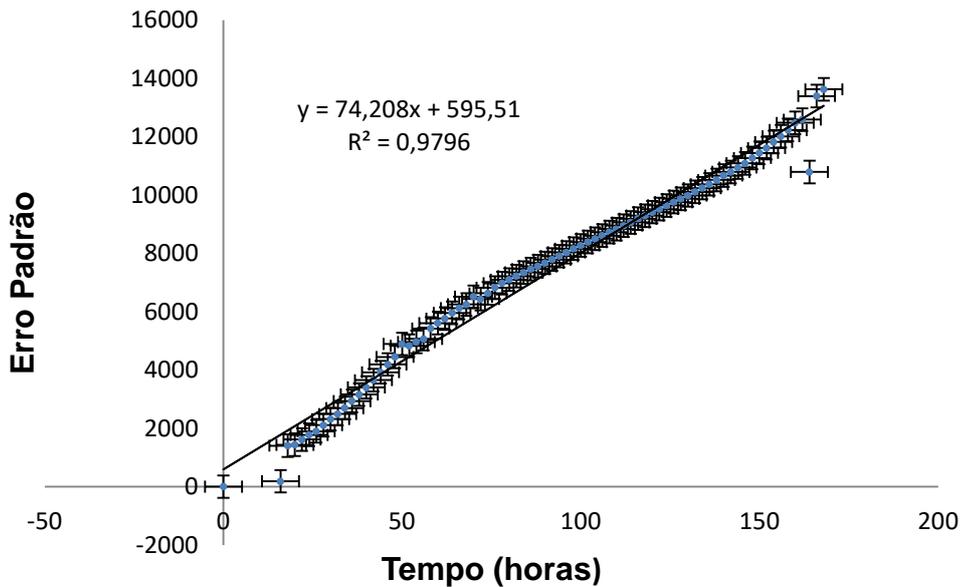
preditiva utiliza estas etapas principalmente para fornecer maiores informações sobre o comportamento microbiano em diferentes situações, dando subsídio a segurança e qualidade dos alimentos (NAKASHIMA et al., 2000).

### Derivada



**Figura 22:** Gráfico da derivada discreta apresentando máximos de crescimento de 50 a 58 horas

O gráfico de erro padrão mostrou-se aceitável pois a curva ajustada passa pelas barras de erro, obtendo-se um valor de  $R^2 = 0,97$ , e há apenas três pontos fora da curva (Figura 23).

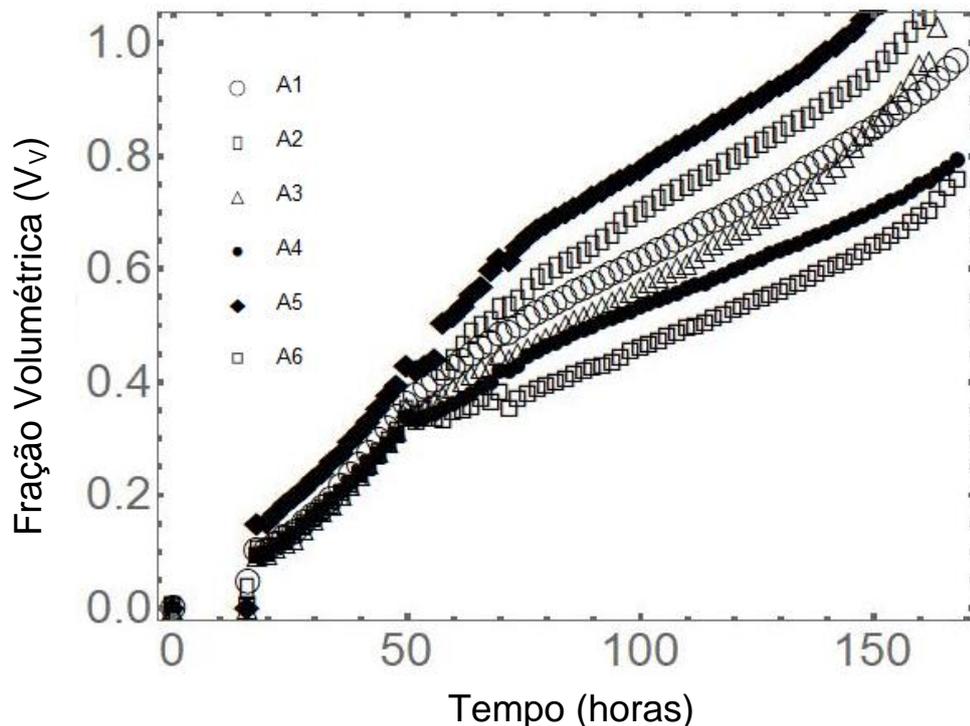


**Figura 23:** Gráfico de Erro Padrão

A observação individual das colônias de *Penicillium sp.*(Figura 24), viabilizou a análise do perfil de crescimento. Através da sobreposição das curvas de crescimento nota-se a tendência comportamental no crescimento até aproximadamente 50-58 horas. A partir de então há uma transição de perfil de crescimento mais abrupta para a colônia A5, que por possuir germinação de esporos maior acabou por formar outra colônia ao seu lado, obtendo um valor de  $V_v$  mais alto que as outras colônias. A A2 foi a segunda maior, a A3 e a A1 são a terceira e quarta em ordem de tamanho ficando mais próximas no gráfico, A4 e A6 foram as menores no perfil de crescimento, apresentando curvas mais suavizadas. O crescimento heterogêneo das colônias observadas neste trabalho se deve à forma de reprodução do *Penicillium sp.* De acordo com Dantigny et al. (2005) as bactérias se reproduzem por fissão e normalmente crescem de maneira homogênea através de um meio líquido ou sólido, enquanto os fungos possuem hifas fúngicas que podem penetrar na matriz física tridimensional dos meios.

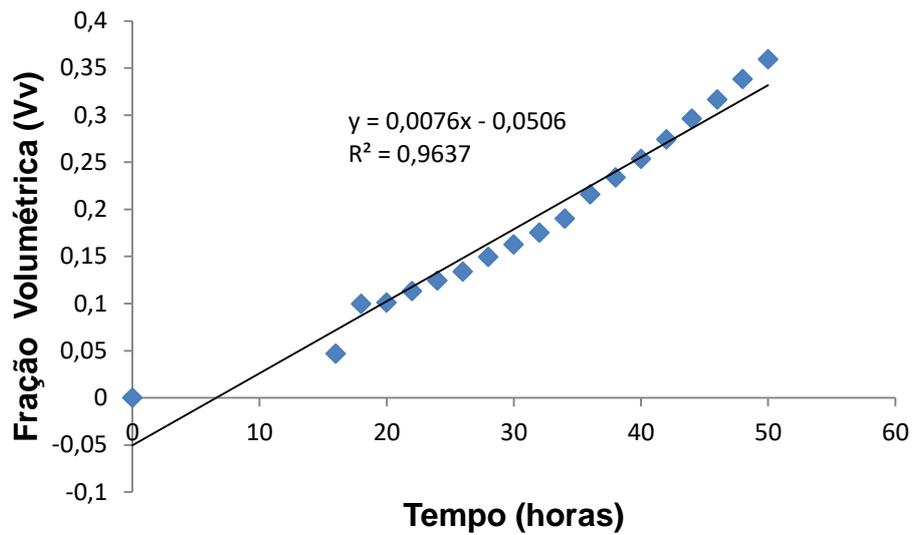
Nanguy et al.(2010) relatam que a germinação de esporos fúngicos com o mesmo estado fisiológico e as mesmas condições de germinação são muito heterogêneas em termos de tempo de germinação individual.

Relacionou-se neste trabalho, a diferença entre as colônias devido à não uniformidade na quantidade de *Penicillium sp.* em cada gota semeada no meio de cultura, uma vez que a pipeta Pasteur não possui um volume fixo calibrado.

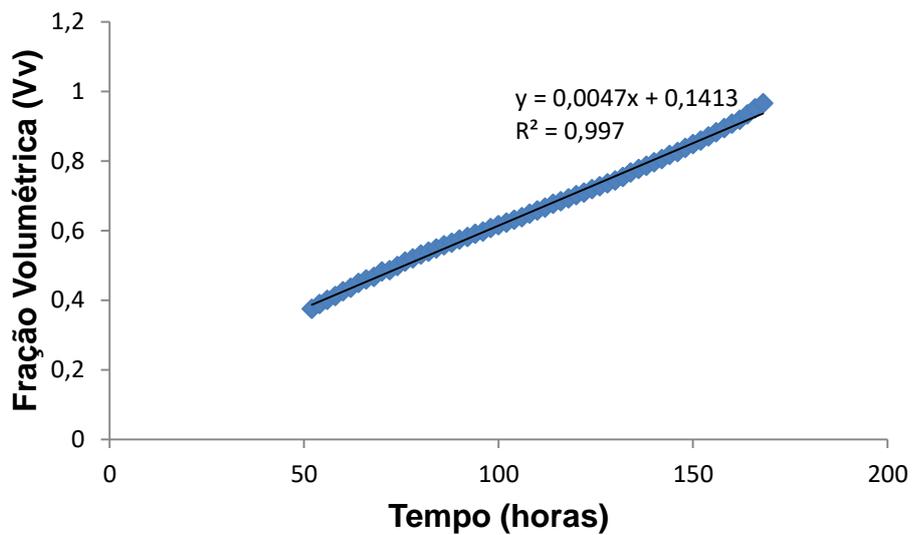


**Figura 24:** Sobreposição das curvas de crescimento individuais das colônias do *Penicillium sp.*

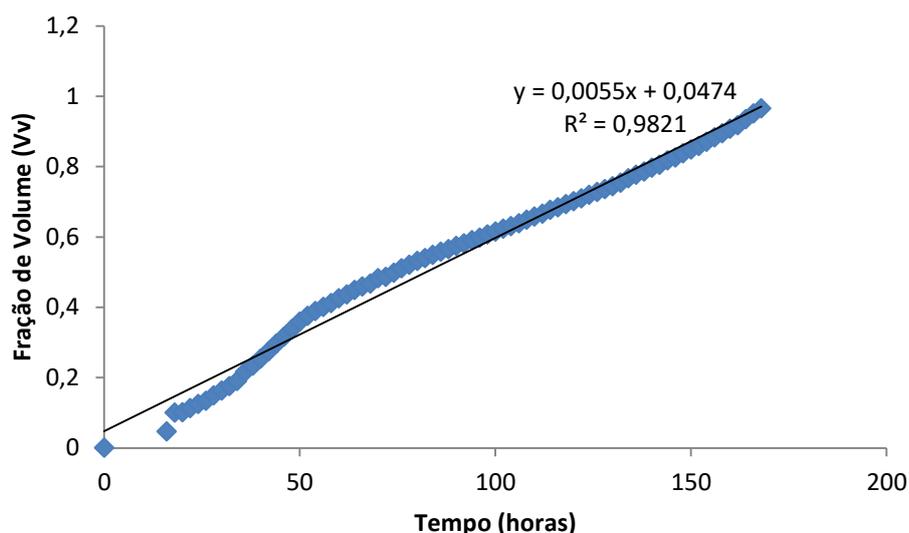
O desenvolvimento do *Penicillium sp.* foi ajustado pelo modelo linear. As figuras 25, 26 e 27 apresentam os gráficos após ajuste do modelo matemático, com aplicação de ajuste do coeficiente de ajuste linear nos tempos de 0 a 50 horas, de 52 a 168 horas e de 0 a 168 horas, respectivamente.



**Figura 25:** Gráfico após ajuste de modelo matemático com aplicação de ajuste de coeficiente linear de 0 a 50 horas.



**Figura 26:** Gráfico após ajuste de modelo matemático com aplicação de ajuste de coeficiente linear de 52 a 168 horas.



**Figura 27:** Gráfico após ajuste de modelo matemático com aplicação de ajuste de coeficiente linear de 0 a 168 horas.

O ajuste linear baseia-se em uma equação do primeiro grau, como descrito na equação 17:

$$F(X) = ax + b \quad \text{Equação 17}$$

Em que:

$ax$  = coeficiente de inclinação

$b$  = valor onde o eixo X cruza com o eixo Y

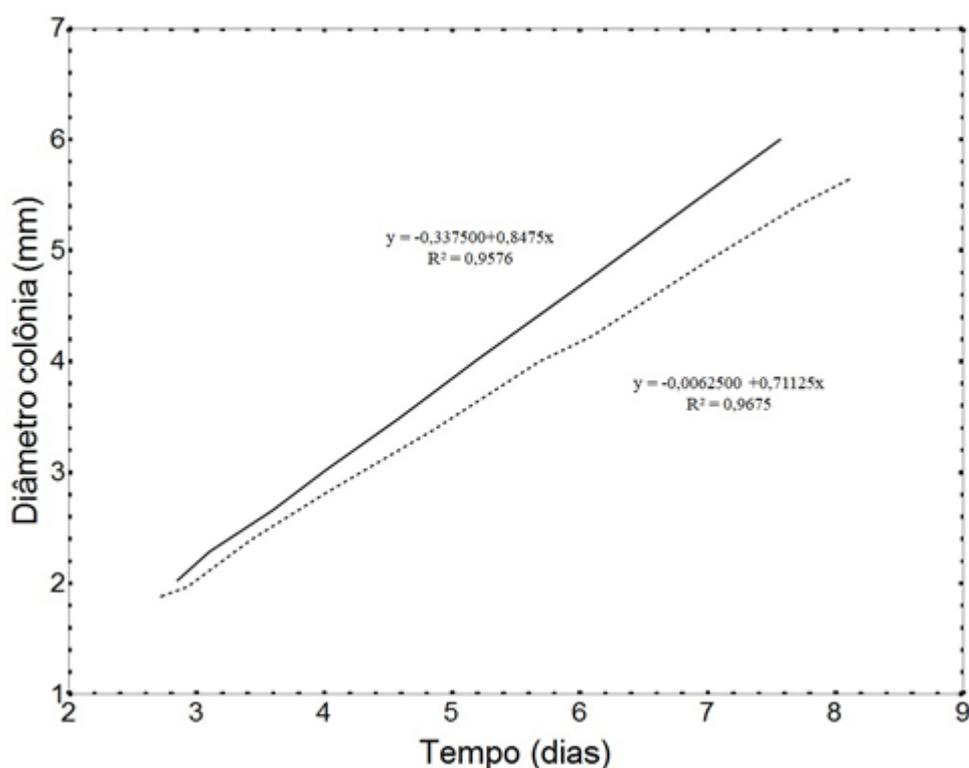
Os modelos matemáticos têm por função representar a curva de crescimento, em uma ou mais fases, utilizando equações, que possuem uma parte determinística, que representa as variáveis e cujo comportamento é esperado, e uma parte estocástica, que pode ou não existir no modelo e cujo comportamento é aleatório e desconhecido (DANNENHAUER, 2010).

Nesse contexto, no presente trabalho foi possível aplicar a microbiologia preditiva lançando-se mão da EQ como ferramenta para quantificar e prever o crescimento do *Penicillium sp.* em função do tempo.

Comparando os três gráficos (Figuras 23, 24 e 25) é possível observar: o primeiro gráfico (Figura 23), relacionado às primeiras horas de crescimento obteve um ajuste inferior com relação às horas finais, após 50 horas (Figura 24), e o total (Figura 25) apresentando  $R^2$  (coeficiente de determinação) de 0,96, 0,99 e 0,98, respectivamente. Nas horas finais (50 a 168 horas) os valores observados são mais próximos para a cinética de crescimento do *Penicillium sp.*, uma vez que quanto mais próximo de 1 está o valor de  $R^2$  melhor é o ajuste da equação da reta. O menor valor de  $R^2$  pode ser atribuído à fase lag em que houve um período de adaptação observado de 0 a 16 horas no desenvolvimento do *Penicillium sp.*, o valor intermediário referente ao tempo total se deve à média entre o

maior e menor valor de  $R^2$ . Uma vez que o maior valor de  $R^2$  relaciona-se com a fase exponencial em que houve o maior pico de crescimento e então o valor está mais próximo de 1. Posteriormente à adequação da equação, portanto do modelo matemático, procedeu-se à aplicação do ajuste de coeficiente linear permitindo extrapolar o crescimento microbiano em função do tempo, portanto, adequa-se ao modelamento matemático previsto pela microbiologia preditiva.

Oliveira et al (2006) estudaram as reações do inhamo em relação à severidade da podridão-verde, causada pelo fungo *Penicillium sclerotigenum*. Analisaram, in vitro, o crescimento micelial de *P. sclerotigenum* em três meios de cultura semi-sintéticos. Constatando que o meio Batata Dextrose Ágar (BDA) foi o mais eficiente para o crescimento deste fungo. Constataram que o gráfico de crescimento linear foi o que mais se adequou para o microrganismo estudado (Figura 28).



**Figura 28:** Representação pelo modelo linear do crescimento micelial de dois isolados de *Penicillium sclerotigenum* no meio de cultivo: BDA (adaptado de OLIVEIRA et al. 2006).

Andrade et al. 2010, avaliaram o crescimento micelial *in vitro* de linhagens do fungo basidiomiceto, *Agaricus bisporus* em meios de cultura sólidos, realizando medições de quatro diâmetros das colônias, a cada 48h, durante 12 dias de incubação, no escuro, a 20 e 25°C. Com base nos resultados obtidos, verificaram que a temperatura de 25°C foi mais favorável para o crescimento micelial. Os dados referentes ao crescimento foram ajustados a um modelo linear.

Este trabalho demonstrou que o modelo linear foi o que melhor se adequou para descrever o crescimento do *Penicillium sp.*. Dados da utilização da EQ para descrever o crescimento de fungos não são reportados na literatura, sendo este trabalho o pioneiro o

que torna os seus resultados de difícil discussão, mas de grande relevância para uma nova técnica a ser utilizada na microbiologia preditiva.

## 6 CONCLUSÃO

A adequação da técnica de obtenção de imagens por fotografias para aplicação da estereologia quantitativa, bem como o uso do software *ImageJ*® para o tratamento das imagens, demonstraram-se um método eficaz para a quantificação do crescimento do *Penicillium sp.*

A utilização do método estereológico, bem como a escolha do modelo matemático a ser empregado para avaliar a fração volumétrica do *Penicillium sp.* durante 7 dias permitiu correlação com a microbiologia preditiva, uma vez que foi possível obter uma descrição quantitativa para predição da cinética de crescimento.

Os resultados demonstraram que pelo uso do ajuste de equação é possível extrapolar o crescimento microbiano em função do tempo no gráfico, possibilitando a predição do desenvolvimento microbiano.

O tratamento de dados através da estereologia quantitativa permitiu avaliar o crescimento microbiano. A observação do tempo de adaptação do microrganismo ao meio e a fase de desenvolvimento a partir do estudo morfométrico, se mostra uma nova ferramenta facilitadora, para utilizar a microbiologia preditiva.

Tendo em vista a relevância do tema desta pesquisa, mais estudos são necessários para elucidar e aplicar os métodos estereológicos na microbiologia preditiva. Para a realização de futuras pesquisas destacamos a importância de empregar a nova técnica proposta nos alimentos, visando a segurança e a qualidade dos mesmos.

## 7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADRIO, J.L., ARNOLD, L.D. Fungal Biotechnology. **International Microbiology.**; v.6, p. 191-199,2003.

AMENÁBAR, J. M., PADILHA, D. M. P., HUGO, F. N., E FOSSATI, A. C. M. Uso da estereologia como método na pesquisa histológica. **Revista. Faculdade. Odontologia.**,v. 44, n.1, p.62-65, 2003.

AMSON, G. V., HARACEMIV, S. M. C., MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência. agrotec.**, v.30,n.6, p.1139-1145, 2006.

ANDRADE, M. C. N. DE; CHAVARI, J. L.; MINHONI, M. T. DE A.; ZIED, D. C. Crescimento micelial in vitro de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidas a diferentes condições de temperatura. **Acta Scientiarum. Agronomy**, n. 1, v. 32, p. 69-72, 2010.

ANASTÁCIO, A. Microbiologia Preditiva Alimentar: As sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação. **Segurança e Qualidade Alimentar** , n.7, p.56-59, 2009.

ARROYO-LÓPEZ, F. N.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; GARRIDO FERNÁNDEZ, A. **Predictive microbiology: a valuable tool in food safety**. In: BHAT, R.; GOMEZ-LOPEZ, V. M. (Ed.). *Practical food safety: contemporary issues and future directions*. West Sussex: Wiley Blackwell, 2014, 534p.

ASSIS, W.L.S. **Investigação do efeito da nucleação, da velocidade de crescimento e da distribuição da energia armazenada na recristalização pelo método autômato celular em três dimensões**. 2006. 126f. Dissertação de Mestrado Pós-Graduação da Escola de Engenharia Industrial Metalúrgica de Volta Redonda. Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, RJ.

AUGUSTIN, J.-C. ; ZULIANI, V. ; CORNU, M.; GUILLIER,L. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1019–1042, 2005.

AVVAD-PORTARIL, E.; GOMES, N.D.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Simple hyperplasia *versus* proliferative endometrium: stereological study. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 73-79, 2003.

AZEREDO, H. M. C. de et al. **Princípios dos Métodos de Conservação de Alimentos**. In: FUNDAMENTOS de Estabilidade de Alimentos. 2. ed. Brasília: Técnica, 2012.186 p.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A.A. Dynamic approach to predicting bacterial growth In food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26,p.199-218, 1995.

BARANYI, J.; GIBSON, A. M; PITT, J. I; EYLES, M. J e ROBERTS, T. A. Predictive models as mean of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species. **Food Microbiology**, v.14, p.347-351,1996.

BARANYI, J.; CSERNUS, O.; BECZNER, J. Error analysis in predictive modellingdemonstrated on mould data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 78–82, 2014.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FONTANA JÚNIOR, A. J.; SCHMIDT, S. J.; LABUZA, T. P. **Water activity in foods – Fundamentals and Applications**. 1 ed. New York: John Wiley e Sons, 2007, 435p.

BLACKBURN, W.C.. **The stability and shelf life of Food** Editado por: Kilcast, D.; subramaniam, P. New York: CRC Press LLC, 2000, 340p.

BOARD, R. G. **Intruduction a la microbiologia moderna de los alimentos**. Espanha: Acribia, 1988, 271 p.

BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology. **Trends Food Science Tecnology**.,v. 4, p. 6-11,1993 (b).

CASTRO, L. C.; LUCHESE, R. H.; MARTINS, J. F. P.. Efeito do uso da cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. **Ciência. Tecnologia. Alimentos**, v.20, n.1, pp. 40-46, 2000.

CASTRO, P. S.; COBUCCI, R. M. A.; GALERA, J. S. Determinação de vida útil de alimentos. SEMANA DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS, 11. Goiânia, 2008.

CUPPERS, H. G. A. M., OOMES, S., BRUL, S. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.10, 1997.

DALGAARD, P.; BUCH, P.; SILBERG, S. Seafood Spoilage Predict or development and distribution of a product specific application software. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p. 343-349, 2002.

DANNENHAUER, C.E. **Desenvolvimento de um Aplicativo Computacional para Microbiologia Preditiva**. . 2010. 73 f. Dissertação: Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia deAlimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

DANTIGNY, P., GUILMART, A., BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. **International Journal. Food Microbiology**, v. 100, p.187–196, 2005.

DANTIGNY, P., PANAGOUE, E. **Predictive Mycology**. NewYork: Nova Publishers, 2013, 343p.

DENS, E. J., VAN IMPE, J.F. On the need for another type of predictive model in structured foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 247-260, 2001.

DIAS, F. DA C. **Uso do software imagej para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais**. 2008. 148f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e

Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE , São José dos Campos, SP.

DIGE, I.; NYENGAARD, J. R.; KILIAN, M.; NYVAD, B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. **Oral Microbiology Immunology**, v.24, p. 69–75, 2009.

DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. Campinas: Livraria e Editora Rural. 2002 181p.

DING, T.; WANG, J.; FORGHANI, F.; HA, S.; CHUNG, M.; BAHK, G.; HWANG, I.; ABDALLAH, E.; OH, D. Development of Predictive Models for the Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on Cabbage in Korea. **Journal of Food Science**, v. 77, n.5, 2012.

DOROTA, Z.; DANUTA, K.K.; ANTONIO, G.; MOTYL, I. Predictive Modelling of *Lactobacillus casei* KN291 Survival in Fermented Soy Beverage. **Journal of Microbiology**, v.52, n. 2, p.169-178, 2014.

DUARTE, J.C.F. **Contribuição da microbiologia preditiva na análise de cremes pasteleiros**. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar)- Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova Lisboa, Lisboa, Portugal.

ESKIN, M.; ROBINSON, D. S. **Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes**. Nova York: CRC Press, 2000, 384p.

ERKMEN, O.; ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.161-166, 2002.

ESTEVES, E. M. **Simulação computacional de medidas estereológicas em estruturas de metal duro (WC-Co)**.2011. 187f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

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

FERREIRA, L. D. **Utilização da Microbiologia Preditiva na Avaliação do Crescimento de Bactérias Ácido Lácticas em Presunto Fatiado**. 2004.156f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, SC.

FERRER, J., PRATS, C.,LÓPEZ, D, VIVES-REGO,J. Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 2-8, 2009.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004. 182 p.

FILHO, A. E. F. **Implementação da rotina de unfolding para determinação de distribuição de tamanho de grãos esféricos via distribuição de interceptos lineares e de área de seção**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)

- Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Shelf Life Uma Pequena Introdução. **Food Ingredients Brasil**, n. 8, v. 18, p.67-73, 2011. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/188.pdf> . Acesso em: 20/11/ 2017.

GADEK-MOSZCZAK, A. History of stereology. **Image Anal Stereology**, v.35, p.151-152, 2017.

GIANNUZZI, L., PINOTTI, A., ZARITZKY, N. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. **International Journal. Food Microbiology.**, v.39, p.101-110, 1998.

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

GOMES. S. P. **Avaliação estereológica da microestrutura do fígado em animais desnutridos e submetidos à renutrição protéica**. 2011.Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

GOUGOULI, M., KOUTSOUMANIS, K. P. Relation between germination and mycelium growth of individual spores. **International Journal of Food Microbiology**, n.161, p. 231-239, 2013.

HAJJAJ, H., BLANC, P., GROUSSAC E., URIBELARREA, J.L., GOMA, G., LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p. 619-625, 2000.

HAMILTON, P.W. **Interactive computer-aided morphometry**, Quantitative Clinical Pathology, Eds.: P.W. Hamilton, D.C. Allen, USA: Blackwell-Science Press, 1997, 342 p,

HANNICKEL, A. Image J como ferramenta para medida da área de partículas de magnetita em três escalas nanométricas. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 4, p. 16-26, 2002.

HOFFMANN, F. L. Fatores Limitantes à Proliferação de Microrganismos em Alimentos. **Brasil Alimentos**, v. 9, p.23-30, ago. 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JUNEJA, V.K, VALENZUELA-MELENDRÉS, M., HEPERKAN, D., (...), CAMOU, J.P., TORRENTERA-OLIVERA, N. Development of a predictive model for *Salmonella* spp. reduction in meat jerky product with temperature, potassium sorbate, pH, and water activity as controlling factors. **International Journal of Food Microbiology**, n.236, p. 1-8, 2016.

KIM, H.W., LEE, K., KIM, S.H., RHEE, M.S. Predictive modeling of bacterial growth in ready-to-use salted napa cabbage (*Brassica pekinensis*) at different storage temperatures. **Food Microbiology** , v.70, p.129-136, 2018.

KOCH, A.L. The Kinetics of Mycelial Growth. **Journal General Microbiology**, v.89, p.209–216, 1975.

LAICH, F., FIERRO, F., CARDOZA, R. E. E MARTÍN, J. F. Organization of the gene cluster for biosynthesis of penicillin in *Penicillium nalgiovense* and antibiotic production in cured dry sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 65, p.1236–1240, 1999.

LAMBERT, W.C., LAPIDUS, A., RAO, B.K. Melanoma diagnosis by computerized analysis of clinical images. **Archives of Dermatology**, n. 3, v. 137, p. 377-378, 2001.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não- isotérmicas**. 2012. 114 f. Dissertação: Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

LOPEZ, S.; PRIETO, M.; DIJKSTRA, J., DHANOA, M. S.; FRANCE, J.,. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal Food Microbiology**, v. 96, p. 289-300, 2004.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M., C. ROMÁN-BLANCO, M. T. GARCÍA-ARIAS, M. C. GARCÍA-FERNÁNDEZ, AND M. L. GARCÍA-LÓPEZ. Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. **International Journal of Food Microbiology**, n.30, p.391-395, 1996

LOPES-PAULO, F. Emprego da estereologia em pesquisas colorretais. **Revista Brasileira Colo-proctologia**. v. 22, n. 2, p. 73-76, 2010.

MACAROV C.A., TONG L., MARTÍNEZ-HUÉLAMO M., HERMO M.P., CHIRILA E., WANG Y.X., BARRÓN D., BARBOSA J. Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC–MS/MS. **Food Chemistry**, n. 135, p. 2612–2621, 2012.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro, Ed. UERJ, 1995.

MANDARIM-DE-LACERDA C.A. Stereological tools in biomedical research. **Academia Brasileira de Ciência**. v. 75, p. 469-486. 2003.

MASSAGUER, P.R. Crescimento microbiano e os fatores que o afeta, In: MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**, São Paulo: Varela, 2006, 158p.

MATARAGAS, M.; RANTSIOU, K.; ALESSANDRIA, V.; COCOLIN, L. Estimating the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages relative to temperature, pH and water activity. **Meat Science**, v. 100, p. 171–178, 2015.

MELO-JUNIOR, M. R.,. ARAÚJO-FILHO, J. L. S .; PATU, V. J. R. M; MACHADO, M. C. F. DE P.; BELTRÃO, E. I.C.; CARVALHO JR., L. B. Análise digital de imagens de neoplasias da pele avaliadas pela histoquímica com lectinas: marcador potencial para alterações bioquímicas e diagnóstico diferencial de tumores. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v.42, n.6, p.455-460, 2006.

MCCLURE, P.J.; COLE, M.B.; DAVIES, K.W. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl,

pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **International Journal Food Microbiology**, n.23, p.359-375, 1994.

McDONALD, R., SUN, D.W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, n. 52, p. 1–27, 1999.

McELROY, D.M., JAYKUS, L-A ,FOEGEDING, P. M., Validations and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. **Journal of Food Protection**. v.63, n.02, p.268-272. 2000.

McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. **Predictive microbiology: theory and application**. Taunton: Research Studies, 1993, 340 p.

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

McMEEKIN, T.A., BARANYI, J., BOWMAN, J., DALGAARD, P., KIRK, M., ROSS, T.; SCHMID, S.; ZWIETERING, M.H. Information systems in food safety management. **International Journal of Food Microbiology**,v.112, p. 181–194, 2006.

MILLER, F.A., GIL, M.M., BRANDÃO, T.R.S., SILVA, C.L.M. A Microbiologia Preditiva como Instrumento da Garantia da Segurança de Produtos Alimentares. **Boletim de biotecnologia**, n. 78, p. 8-12, 2004.

MOLINA, M., GIANNUZZI, L. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. **Food Research International**, v.32, p.677-682, 1999.

MORITA, R.Y., MOYER, C.L. Psychrophiles and Psychrotrophs. In: Levin SA, Colwell R, Daily G et al. (eds). **Encyclopedia of biodiversity**, V. 4, p. 917–924., 2007.

NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, D.S.; FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p.41-51, 2000.

NANGUY, S.P.M., PERRIER-CORNET, J. M., BENSOUSSAN, M., DANTIGNY, P.. Impact of water activity of diverse media on spore germination of *Aspergillus* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.273–276, 2010.

NOORAFSHAN, A., NIAZI, B., MOHAMADPOUR, M., HOSEINI, L., HOSEINI, N., OWJI, A. A., RAFATI, A., SADEGHI, Y. KARBALAY-DOUST, S. First and second order stereology of hyaline cartilage: Application on mice femoral cartilage. **Annals of Anatomy**, n. 208, p. 24–30, 2016.

OLIVEIRA, M. E. B. DE, BARATA, R. DE C. B. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Estado de São Paulo, 2008-2010.**Boletim de Epidemiologia Paulista** v.10, n.109, 2013.

OLIVEIRA, I.S., LUZ, E.D.M.N., BEZERRA, J.L., MOURA, R.M., TORRES, G.R.C. e MAIA, L.C. Severidade da podridão-verde em inhames e especialização fisiológica em *Penicillium sclerotigenum*. **Fitopatologia Brasileira**, n. 31, p. 94- 98, 2006.

PADILHA, A. F. **Materiais de engenharia: microestruturas e propriedades**. São Paulo - SP: Hemus, 2007. 343 p.

PERETTI, A. P. DE R. E ARAÚJO, W. M. C. Abrangência do requisito segurança em certificados de qualidade da cadeia produtiva de alimentos no Brasil. **Gestão e Produção**, v. 17, n. 1, p. 35-49, 2010.

PESTKA, J. 1995. **Fungal toxins in raw and fermented meats**, p. 194-216. In G. Campbell-Platt and P. E. Cook (ed.), *Fermented meats*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.

POUILLOT, R.; LUBRAN, M. B. Predictive microbiology models vs. modeling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: What parameters matter and why. **Food Microbiology**, v. 28, p.720-726, 2011.

RICHE, F., SCHNEEBELI, M., TSCHANZ, S.A. Design-based stereology to quantify structural properties of artificial and natural snow using thin sections. **Cold Regions Science and Technology**, v.79-80, p. 67-74, 2012.

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

RUSS, J. C.; DEHOFF, R. T. **Practical stereology**. 2.ed. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2000. 307 p.

SABINO, M. **Micotoxinas em alimentos**. In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu Editora, 1996. p. 461-71.

SALES, D. S. **Desenvolvimento de um software livre para análise de imagem com estereologia quantitativa**. 2014. 187 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos, RJ.

SANTANA, L.A. **Tratamento de Úlceras Venosas por Ultra-Som de Baixa Intensidade: Avaliação por Análise de Imagem e Imunohistoquímica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

SANTOS, W. P. **Análise Digital de Imagens em Patologia: Ferramentas de Morfologia Matemática e Lógica Fuzzy**. New York: CreateSpace, 2009

SARMENTO, C.M.P. **Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Validade comercial de mortadela e linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

SAVOV, A.; KOUZMANOV, G. B. Food quality and safety standards at a glance. **Biotechnology e Biotechnological Equipment**, v. 23, n. 4, p. 1462-1468, 2014.

SILVA, J.A. **Tópicos da tecnologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

SILVA, A. G. P. **Introdução à estereologia**. Laboratório de Materiais Avançados - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2007.

SILVA, R.R.; MORAES, C.A.; BESSAN, J.; VANETTI, M.C.D. Validation of a predictive model describing growth of salmonella in enteral feeds. *Brazilian Journal of Microbiology* [online], v. 40, p. 149-154, 2009.

SIQUEIRA, A. A. **Sistema para desenvolvimento de modelos microbiológicos de predição e contagem de colônias por análise computacional de fotografias.** 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, BA.

SKINNER, G.E., LARKIN, J.W., RHODEHAMEL, E.J. Mathematical modelling of microbial growth: a review. **J. Food Safety**, v. 14, p.175-217, 1994.

SWINNEN, I.A.M.; BERNAERTS, K.; DENS, E.J.J.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 137–159. 2004.

TELEKEN, J. T.; ROBAZZA, W. S.; GOMES, G. A. Mathematical modeling of microbial growth in Milk. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, v. 31, n. 4, p. 891-896. 2011.

TSOTSAS, E.; MUJUMDAR, A. S. **Modern Drying Technology - Volume 3: Product Quality and Formulation.** 1st ed. New York: Wiley, 2011.

TOLEDO, J. C.; BORRAS, A. A. M.; SCALCO, A. R.; LIMA, L. S. Coordenação da qualidade em cadeias de produção: Estrutura e Método para Cadeias Agroalimentares. **Gestão e Produção**, v.11, n.3, p.355-372, set-dez., 2004.

UNDERWOOD, E. E. **Quantitative stereology.** Reading, Massachusetts: AddisonWesley Publishing Company, p. 274, 1970.

VAN IMPE, J.F., POSCHET F., GEERAERD , A.H., VEREECKEN K.M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, p.97–105, 2005.

WANG, J.; MEMBRÉ, J.; HÁ, S.; BAHK, G.; CHUNG, M.; CHUN, H.; HWANG, I.; OH, D. Modeling the Combined Effect of Temperature and Relative Humidity on Escherichia coli O157:H7 on Lettuce. **Food Science. Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 859-865, 2012.

WHITING, R.C.; BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology** , v. 10, p. 175-177, 1993.

WHITING, R. C. Microbial modelling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 35, 467-494, 1995.

WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L. Predictive Modeling. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology - fundamentals and frontiers.** Washington: A SM, p.728-739, 1997.

## ANEXOS

### Anexo A

**Tabela 1:** Tempo e área total em pixels do *Penicillium sp.*

Tempo	A <sub>total</sub>	Tempo	A <sub>total</sub>
16	1113	94	8435
18	8435	96	8612
20	8612	98	9700
22	9700	100	10650
24	10650	102	11391
26	11391	104	12658
28	12658	106	13901
30	13901	108	14957
32	14957	110	16166
34	16166	112	17612
36	17612	114	18974
38	18974	116	20422
40	20422	118	21909
42	21909	120	23540
44	23540	122	25458
46	25458	124	27342
48	27342	126	28760
50	28760	128	29921
52	29921	130	30864
54	30864	132	31655
56	31655	134	32535
58	32535	136	33642
60	33642	138	34594
62	34594	140	35762
64	35762	142	36738
66	36738	144	37493
68	37493	146	38607
70	38607	148	39089
72	39089	150	39785
74	39785	152	40929
76	40929	154	41866
78	41866	156	42574
80	42574	158	43306
82	43306	160	44063
84	44063	162	44771
86	44771	164	45338

88	45338	166	46041
90	46041	168	46719
92	46719	-	-

Anexo B

**Tabela 2:** Tempo e área individual total em pixels do *Penicillium sp.*

Tempo	A1 <sub>total</sub>	A2 <sub>total</sub>	A3 <sub>total</sub>	A4 <sub>total</sub>	A5 <sub>total</sub>	A6 <sub>total</sub>
16	635	478	0	0	0	0
18	1356	1367	1248	1264	2015	1185
20	1375	1401	1279	1289	2061	1207
22	1539	1556	1460	1485	2262	1398
24	1691	1716	1570	1651	2482	1540
26	1820	1811	1670	1786	2636	1668
28	2033	2003	1885	2003	2849	1885
30	2215	2221	2112	2198	3071	2084
32	2387	2359	2315	2379	3258	2259
34	2590	2527	2485	2591	3501	2472
36	2941	2740	2730	2787	3734	2680
38	3185	2977	2948	3002	3980	2882
40	3450	3216	3193	3218	4237	3108
42	3732	3452	3459	3433	4487	3346
44	4033	3720	3739	3675	4787	3586
46	4310	3994	4000	3919	5087	3842
48	4606	4245	4263	4170	5343	4071
50	4891	4753	4836	4587	5836	4458
52	5105	4621	4676	4505	5708	4373
54	5293	4753	4836	4587	5836	4458
56	5460	4851	4978	4675	5972	4464
58	5603	5755	5123	4787	6835	4432
60	5790	5986	5306	4889	7026	4645
62	5937	6280	5456	5011	7253	4657
64	6116	6598	5626	5153	7509	4760
66	6252	6782	5770	5287	7719	4928
68	6357	6912	5836	5404	8122	4862
70	6566	7192	6099	5689	8418	5125
72	6621	7246	5991	5686	8359	4704
74	6781	7421	6133	5826	8665	4959
76	6955	7697	6256	6063	8898	5060
78	7086	7937	6373	6196	9097	5177
80	7230	8059	6482	6306	9221	5276
82	7342	8190	6617	6396	9399	5362
84	7465	8337	6798	6500	9520	5443
86	7591	8461	6929	6612	9650	5528
88	7688	8572	7029	6675	9769	5605
90	7813	8729	7138	6771	9900	5690
92	7917	8877	7264	6889	10012	5760
94	8043	9031	7375	6971	10179	5830
96	8135	9285	7499	7059	10289	5946

98	8266	9416	7617	7132	10428	6110
100	8379	9535	7736	7240	10552	6190
102	8483	9677	7857	7317	10714	6274
104	8589	9841	7958	7424	10864	6348
106	8692	9964	8080	7490	10980	6444
108	8832	10077	8200	7585	11143	6546
110	8958	10188	8274	7672	11259	6644
112	9065	10307	8452	7770	11393	6712
114	9220	10426	8597	7825	11516	6787
116	9313	10544	8768	7932	11658	6906
118	9435	10705	8871	8006	11774	6970
120	9550	10843	9010	8112	11888	7087
122	9656	10942	9110	8198	12040	7168
124	9794	11084	9217	8307	12163	7289
126	9907	11209	9388	8392	12289	7350
128	10021	11337	9476	8501	12434	7455
130	10129	11461	9625	8591	12558	7542
132	10266	11602	9746	8679	12709	7645
134	10436	11736	9892	8758	12850	7746
136	10581	11834	10064	8863	13009	7855
138	10700	12020	10242	8964	13202	7969
140	10842	12161	10454	9043	13405	8101
142	10963	12304	10643	9147	13537	8165
144	11126	12464	10852	9244	13724	8258
146	11246	12583	11117	9341	13895	8347
148	11402	12748	11370	9451	14146	8492
150	11551	12946	11592	9552	14393	8629
152	11687	13153	11867	9668	14564	8728
154	11847	13382	12133	9786	14889	8875
156	12016	13621	12446	9887	15113	9008
158	12184	13866	12717	10034	15381	9201
160	12355	14193	13068	10195	15687	9357
162	12497	14264	13167	10258	15869	9467
164	12721	1464	13990	10429	16388	9754
166	12950	15092	14786	10602	16914	10015
168	13147	15420	14994	10781	17193	10218

Anexo C

**Tabela 3:** Resultado do Erro Padrão em pixels do *Penicillium sp*

Tempo	Erro Padrão	Tempo	Erro Padrão
16	185,5	94	7904,8
18	1405,8	96	8035,5
20	1435,3	98	8161,5
22	1616,6	100	8272
24	1775	102	8387
26	1898,5	104	8504
28	2109,6	106	8608,3

30	2316,8	108	8730,5
32	2492,8	110	8832,5
34	2694,3	112	8949,8
36	2935,3	114	9061,8
38	3162,3	116	9186,8
40	3403,7	118	9293,5
42	3651,5	120	9415
44	3923,3	122	9519
46	4192	124	9642,3
48	4449,7	126	9755,8
50	4893,5	128	9870,6
52	4831,3	130	9984,3
54	4960,5	132	10107,8
56	5066,6	134	10236,3
58	5422,5	136	10367,6
60	5607	138	10516,2
62	5765,6	140	10667,6
64	5960,3	142	10793,1
66	6123	144	10944,6
68	6248,8	146	11088,1
70	6514,8	148	11268,2
72	6434,5	150	11443,8
74	6630,8	152	11611,2
76	6821,5	154	11818,7
78	6977,6	156	12015,1
80	7095,6	158	12230,5
82	7217,6	160	12475,8
84	7343,8	162	12587
86	7461,8	164	10791
88	7556,3	166	13393,1
90	7673,5	168	13625,5
92	7786,5	-	-

Anexo D

**Tabela 4:** Resultado da Derivada discreta em pixels do *Penicillium sp*

Tempo	Erro Padrão	Tempo	Erro Padrão
16	-185,5	94	-118,3
18	-1220,3	96	-130,7
20	-29,5	98	-126
22	-181,5	100	-110,5
24	-158,3	102	-115
26	-123,5	104	-117
28	-211,2	106	-104,3
30	-207,2	108	-122,2
32	-176	110	-102

34	-201,5	112	-107,3
36	-241	114	-112
38	-227	116	-125
40	-241,3	118	-106,7
42	-247,8	120	-121,5
44	-271,8	122	-104
46	-268,7	124	-123,3
48	-257,7	126	-113,5
50	-443,8	128	-114,8
52	62,2	130	-113,7
54	-129,2	132	-123,5
56	-106,2	134	-128,5
58	-355,8	136	-131,3
60	-184,5	138	-148,5
62	-158,7	140	-151,5
64	-194,7	142	-125,5
66	-162,7	144	-151,5
68	-125,8	146	-143,5
70	-266	148	-180
72	80,3	150	-175,7
74	-196,3	152	-167,3
76	-190,7	154	-207,5
78	-156,2	156	-196,5
80	-118	158	-215,3
82	-122	160	-245,3
84	-126,2	162	-111,2
86	-118	164	1796
88	-94,5	166	-2602,2
90	-117,2	168	-232,3
92	-113	-	-