



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Faculdade de Engenharia  
Departamento de Engenharia Electromecânica

# **Dispositivo de monitorização da segurança alimentar**

**Pedro Nuno dos Santos Pinto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Eletrotécnica e de Computadores**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Pedro Dinis Gaspar

Covilhã, outubro de 2015

---

## Agradecimentos

À minha família, que me permitiu chegar até aqui e nunca desistiu de me dar forças para continuar.

Ao Professor Doutor Pedro Dinis Gaspar, meu orientador, por me ter sugerido este tema, assim como pelo apoio e orientação que me facultou nestes meses.

A todos os meus amigos do curso, que estiveram ao meu lado durante este percurso académico e me apoiaram quando precisei, em especial ao David Martins pela orientação relativa à eletrónica utilizada, e aos quais desejo que concretizem os seus sonhos como Engenheiros Electrotécnicos.

Aos meus amigos mais próximos, tanto aqueles com quem vivi durante o período universitário, como aqueles com quem mais convivo na Guarda, e a quem desejo as maiores felicidades para o futuro.

A quem esteve comigo de um modo mais próximo, que me apoiou na conquista dos meus sonhos, que esteve do meu lado, que me deu forças para não desistir nos momentos mais difíceis, ainda que por vezes também os tenha provocado, mas que de um modo geral marcou, positivamente, o meu percurso nos últimos 5 anos.

29-09-2011

---

## Resumo

Com o objetivo de reduzir o desperdício alimentar, esta dissertação incide no desenvolvimento de um dispositivo que, a partir da monitorização da temperatura e da humidade relativa do ar no interior de equipamentos de refrigeração, utiliza um modelo científico que define as curvas de crescimento microbiano. Trata-se de um dispositivo que suplanta as características dos dataloggers disponíveis no mercado destinados a esta função, por possibilitar o cálculo do crescimento microbiano para diversas bactérias e para alertar o utilizador quando a dose infetante de microrganismos patogénicos nos alimentos em análise é atingida.

De modo a determinar as curvas de crescimento microbiano, foi utilizado o modelo matemático desenvolvido por Baranyi & Roberts (1994), assim como a ferramenta *Combined Database for Predictive Microbiology - Combase*, disponível online, para a determinação dos coeficientes que definem o desenvolvimento de cada bactéria. Estes coeficientes, através da expressão que calcula o declive máximo da curva de crescimento, relacionam o crescimento da bactéria em análise com os parâmetros intrínsecos e extrínsecos que definem o ambiente em que a bactéria se encontra. A determinação desta equação permitiu gerar gráficos tridimensionais que relacionam as grandezas referidas - declive máximo de crescimento, temperatura, pH e atividade de água.

O dispositivo é controlado a partir do microcontrolador PIC16F1716, em conjunto com o sensor de temperatura e humidade relativa AOSONG AM2302. O circuito é alimentado a partir de uma bateria AA da TADIRAN, concebida para operar na gama de temperaturas de -55°C a +125°C. A visualização dos dados fornecidos pelo sensor, armazenados na memória do microcontrolador, é realizada através de um interface gráfico, criado com a ferramenta GUIDE do Matlab, que permite ao utilizador selecionar quais os alimentos que pretende analisar, assim como visualizar as curvas de crescimento para cada bactéria quando sujeitas ao ambiente presente no equipamento de refrigeração.

## Palavras-chave

Dispositivo de Monitorização, Segurança alimentar, Crescimento Microbiano, Interface gráfico.

---

## Abstract

In order to reduce food waste, this MSc dissertation focuses on the development of a monitoring device of air temperature and relative humidity inside of refrigeration that uses a scientific model of the microbial growth curves. It is a monitoring device that supplants the characteristics of the dataloggers for this function available in the market, by enabling the calculation of the microbial growth for a variety of bacteria and by alerting the user when the infective dose of pathogenic microorganisms in the food item is reached.

To determine the bacteria growth curves, the Baranyi and Roberts (1994) model and the tool *Combined Database for Predictive Microbiology - Combase*, available online, were used to determine the factors that define the growth of each bacteria. These factors, applied to the equation that determines the maximum specific growth rate, establish a relation between the bacterial growth and the intrinsic and extrinsic factors that define the environment of the bacteria. The determination of the equation coefficients, allows generating tri-dimensional graphs with the four relevant parameters - maximum specific growth rate, temperature, pH and water activity.

The device is controlled by a microprocessor PIC16F1716, along with the temperature and relative humidity sensor AOSONG AM2302. The circuit power source is an AA TADIRAN battery that operates in the temperature range between -55°C and +125°C. For the visualization of the data sent by the sensor, which is kept in the PIC memory, a graphical user interface was developed using the GUIDE Matlab toolbox, that allows the user to select which food product wants to study and also to visualize the growth curve for each bacteria that was subjected to the environment in the refrigerator.

## Keywords

Monitoring device, Food safety, Microbial growth, Graphical interface.

# Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índice .....	v
Lista de Figuras .....	vii
Lista de Tabelas .....	x
Nomenclatura .....	xi
<b>1. Introdução .....</b>	<b>14</b>
1.1. Enquadramento .....	14
1.2. O problema em estudo e a sua relevância .....	16
1.3. Objetivos e contribuição da dissertação .....	16
1.4. Visão geral e organização da dissertação .....	17
<b>2. Estado da Arte .....</b>	<b>18</b>
2.1. Introdução .....	18
2.2. Segurança alimentar .....	18
2.2.1. Fatores intrínsecos e extrínsecos .....	18
2.2.2. Bactérias estudadas .....	21
2.3. Modelo matemático da curva de crescimento .....	26
2.3.1. Modelo de crescimento microbiano .....	26
2.3.2. Origem do modelo matemático da curva de crescimento .....	27
2.3.3. Modelo de Baranyi e Roberts .....	29
2.4. Nota conclusiva .....	31
<b>3. Protótipo experimental .....</b>	<b>32</b>
3.1. Introdução .....	32
3.2. Simplificação do modelo de Baranyi & Roberts .....	32
3.2.1. Determinação do declive máximo de crescimento .....	35
3.3. Montagem do circuito do dispositivo .....	40
3.3.1. Programação do dispositivo .....	47
3.4. Interface gráfico do utilizador .....	51
3.4.1. <i>GUIDE</i> .....	51
3.4.2. Interface gráfico para crescimento bacteriano com parâmetros constantes .....	52

---

3.4.3. Interface gráfico para crescimento bacteriano com parâmetros variáveis	55
3.4.4. Interface do dispositivo	57
3.5. Procedimentos de teste	60
3.6. Nota conclusiva	62
<b>4. Análise e Discussão de Resultados</b>	<b>63</b>
4.1. Introdução	63
4.2. Influência da temperatura, pH e atividade de água no declive máximo de crescimento	63
4.3. Testes a temperatura de refrigeração	82
4.4. Nota conclusiva	89
<b>5. Conclusões</b>	<b>90</b>
5.1. Considerações gerais	90
5.2. Considerações específicas	91
5.3. Sugestões de trabalhos futuros	92
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>93</b>
Webgrafia	95

## Lista de Figuras

Figura 1 - Percentagem de comida desperdiçada. ....	14
Figura 2 - Curva de crescimento bacteriano (Willey <i>et al.</i> , 2009). ....	26
Figura 3 - Influência dos parâmetros da equação de crescimento na curva de Gompertz. ....	28
Figura 4 - Relação entre a curva de crescimento e as variáveis do modelo de Baranyi e Roberts (Baranyi, 2010). ....	29
Figura 5 - Efeito de parâmetros selecionados na transição entre as fases da curva de crescimento (Baranyi, 2010). ....	30
Figura 6 - Relação tempo/temperatura para fatias de presunto de peru entre a fase de produção e o consumidor (Gogou <i>et al.</i> , 2014). ....	33
Figura 7 - Exemplo da ferramenta <i>ComBase Predictor</i> para a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> . ....	36
Figura 8 - Circuito de teste concebido para monitorização da temperatura e humidade relativa e verificação do crescimento bacteriano para diferentes bactérias. ....	41
Figura 9 - Erros máximos nas medições de humidade relativa e de temperatura pelo sensor AM2302. ....	42
Figura 10 - Componentes utilizados no circuito de teste do dispositivo (da esquerda para a direita: pilha TL-5903, sensor AM2302, conversor de UART para USB). ....	43
Figura 11 - Diagrama do circuito de teste. ....	43
Figura 12 - Exemplo 1 de trama de comunicação enviada pelo sensor. ....	44
Figura 13 - Exemplo 2 de trama de comunicação enviada pelo sensor. ....	45
Figura 14 - Envio do sinal de 'Start' pelo PIC. ....	46
Figura 15 - Sinal enviado pelo sensor. ....	46
Figura 16 - Pormenores dos tipos de dados. ....	46
Figura 17 - Fluxograma da programação utilizada no microcontrolador PIC16F1716. ....	47
Figura 18 - Atribuição de nomes aos pinos definidos como entradas e saídas. ....	48
Figura 19 - Fluxograma da verificação do crescimento bacteriano. ....	50
Figura 20 - <i>Toolbox GUIDE</i> . ....	51
Figura 21 - Exemplo de utilização da ferramenta <i>GUIDE</i> . ....	52
Figura 22 - Interface que permite analisar o crescimento de diferentes bactérias em diferentes ambientes. ....	53
Figura 23 - Exemplo de utilização do interface criado. ....	54
Figura 24 - Página apresentada e ficheiro de Excel aberto após ser ativado o botão 'ComBase'. ....	54

Figura 25 - Interface alternativo que prevê o crescimento microbiano com mudanças nos fatores extrínsecos ao longo do tempo. ....	55
Figura 26 - Excel no qual são introduzidos os valores de temperatura, pH e $a_w$ ao longo do tempo. ....	56
Figura 27 - Gráfico correspondente ao exemplo da Figura 25. ....	56
Figura 28 - Ecrã inicial do interface do dispositivo. ....	57
Figura 29 - Confirmação após carregar no botão ‘Reset’. ....	57
Figura 30 - Ecrã apresentado para seleção de novos alimentos. ....	58
Figura 31 - Ecrã apresentado para seleção de novos alimentos. ....	59
Figura 32 - Apresentação dos dados guardados e os gráficos correspondentes. ....	60
Figura 33 - Datalogger da Lascar Electronics EL-USB-2-LCD+. ....	61
Figura 34 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> . ....	65
Figura 35 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> . ....	66
Figura 36 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Bacillus licheniformis</i> . ....	67
Figura 37 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> . ....	68
Figura 38 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Clostridium botulinum</i> . ....	69
Figura 39 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Clostridium perfringens</i> . ....	70
Figura 40 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> . ....	71
Figura 41 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	72
Figura 42 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Salmonella</i> . ....	73
Figura 43 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Shigella flexneri</i> . ....	74
Figura 44 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	75
Figura 45 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Yersinia enterocolitica</i> . ....	76
Figura 46 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Brochothrix thermosphacta</i> . ....	77



Figura 47 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria <i>Pseudomonas</i> . ....	78
Figura 48 - Leitura das medições efetuadas pelo datalogger. ....	82
Figura 49 - Gráficos referentes à temperatura e à humidade relativa medidos num frigorífico doméstico. ....	83
Figura 50 - Figuras apresentadas ao premir o botão ‘Full Graph’ do interface.....	83
Figura 51 - Crescimento de <i>Aeromonas hydrophila</i> em carne de porco. ....	84
Figura 52 - Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em carne de porco. ....	85
Figura 53 - Crescimento de <i>Shigella flexneri</i> em carne de porco.....	86
Figura 54 - Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em carne de porco.....	86
Figura 55 - Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em peixe fresco. ....	87
Figura 56 - Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em peixe fresco. ....	88
Figura 57 - Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em ovos.....	88

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores da atividade de água para diferentes alimentos. ....	20
Tabela 2. Valores de pH para diferentes alimentos. ....	20
Tabela 3. Bactérias responsáveis pela deterioração de cada alimento. ....	25
Tabela 4. Declive máximo para diferentes valores de temperatura, $T$ , potencial de hidrogénio, pH, e atividade de água, $a_w$ , para a bactéria <i>Brochothrix thermosphacta</i> . ....	36
Tabela 5. Matriz A e Matriz B para a bactéria <i>Brochothrix thermosphacta</i> , sendo utilizados os valores base da Tabela 4. ....	37
Tabela 6. Valores de $a_i$ para a bactéria <i>Brochothrix thermosphacta</i> , sendo utilizados os valores base da Tabela 4. ....	38
Tabela 7. Erro no cálculo de $\mu_{\max}$ pela utilização dos valores estimados de $a_i$ . ....	38
Tabela 8. Coeficientes para calcular o declive máximo de crescimento para cada bactéria. ...	39
Tabela 9. Erros relativos no cálculo de $\mu_{\max}$ com valores estimados dos coeficientes $a_i$ . ....	40
Tabela 10. Especificações técnicas do PIC16F1716. ....	42
Tabela 11. Associação de cada alimento a um bit da variável 'Food'. ....	48
Tabela 12. Especificações do datalogger. ....	61
Tabela 13. Parâmetros mínimos, máximos e ótimos para o crescimento bacteriano. ....	81

## Nomenclatura

### Geral:

$a_i$	Coeficientes que caracterizam o declive máximo da curva de crescimento;
$a_w$	Atividade de água;
$b_w$	Constante ( $b_w = \sqrt{1 - a_w}$ );
$e$	Número de Euler ( $e = 0.5772$ );
$e_r$	Erro relativo [%];
$Eh$	Potencial de oxidação/redução;
$ERH$	Equilibrium Relative Humidity [%];
$h_0$	Logaritmo do estado fisiológico de uma bactéria ( $h_0 = -\ln \alpha_0$ );
$HR$	Humidade relativa [%]
$L_x$	Número de pessoas vivas na idade x;
$m$	Parâmetro que define a curvatura entre a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento;
$n_c$	Parâmetro que define a curvatura entre a fase inicial e a fase estacionária de crescimento;
$pH$	Potencial de hidrogénio;
$p_v$	Pressão parcial de vapor de água [mmHg];
$p_{vs}$	Pressão parcial de vapor de água saturado [mmHg];
$t$	Tempo [h];

$T$	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ];
$T_{amb}$	Temperatura ambiente [ $^{\circ}\text{C}$ ];
$X_{\%opt}$	Percentagem da gama de valores em que a bactéria se desenvolve, para o qual o crescimento bacteriano é ótimo (com $X$ = Temperatura ou $X$ = pH);
$X_{opt}$	Valor para o qual o crescimento bacteriano é ótimo (com $X$ = Temperatura ou $X$ = pH);
$X_{min}$	Valor mínimo no qual a bactéria se desenvolve (com $X$ = Temperatura ou $X$ = pH);
$X_{max}$	Valor máximo no qual a bactéria se desenvolve (com $X$ = Temperatura ou $X$ = pH);
$y$	Número logarítmico de unidades formadoras de colónias por grama;
$y_0$	Número inicial de unidades formadoras de colónias por grama;
$y_{max}$	Número máximo de unidades formadoras de colónias por grama.

### **Simbologia grega:**

$\alpha_0$	Estado fisiológico da bactéria;
$\lambda$	Lag [h];
$\mu_{max}$	Declive máximo de crescimento [ $\log(\text{UFC/g})/\text{h}$ ].

### **Acrónimos:**

<b>ASAE</b>	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica;
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations;
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration;
<b>GUI</b>	Graphical User Interfaces;
<b>HACCP</b>	Hazards Analysis and Critical Control Points;

<i>LCD</i>	Liquid Crystal Display;
<i>LED</i>	Light Emitting Diode;
<i>NTC</i>	Negative Temperature Coefficient;
<i>PCC</i>	Ponto crítico de controlo;
<i>PIC</i>	Programmable Intelligent Computer;
<i>RTC</i>	Real Time Clock;
<i>UART</i>	Universal Asynchronous Receiver/Transmitter;
<i>UFC</i>	Unidades formadoras de colónias;
<i>USB</i>	Universal Serial Bus;
<i>WHO</i>	World Health Organization;
<i>WRAP</i>	Waste and Resources Action Programme.

# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento

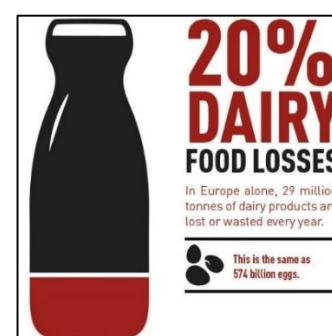
O desperdício alimentar é uma realidade presente, um pouco por todo o mundo. Segundo a FAO (2013), a cada ano, um terço de toda a comida produzida, para consumo humano, é desperdiçada, o que equivale a um valor de 750 mil milhões de dólares em comida não aproveitada. Um estudo, realizado pela mesma organização, revela que 40% de toda a comida produzida nos Estados Unidos da América não é consumida, e 100 milhões de toneladas são deitadas fora na Europa, a cada ano. Em FAO (2015), são revelados alguns dos valores chocantes de uma realidade que cada pessoa contribui para que aconteça (ver Figura 1). Uma parte significativa deste valor é proveniente de comida deitada fora em restaurantes. Em WRAP (2009), foi estimado um valor de 600 mil toneladas de comida desperdiçada em hotéis, pubs e restaurantes do Reino Unido, no ano em que se realizou o estudo.



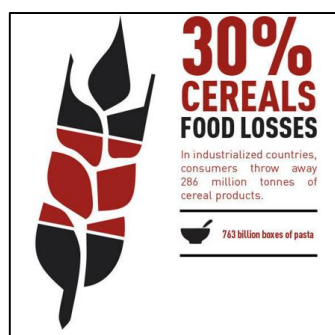
(a) Percentagem de peixe desperdiçado.



(b) Percentagem de carne desperdiçada.



(c) Percentagem de lacticínios desperdiçados.



(d) Percentagem de cereais desperdiçados.



(e) Percentagem de frutos e vegetais desperdiçados.



(f) Percentagem de raízes desperdiçadas.

Figura 1 - Percentagem de comida desperdiçada.

Este desperdício alimentar advém da deterioração dos produtos alimentares ao longo de toda a cadeia alimentar, desde o produtor ao consumidor final, até um ponto em que a segurança alimentar é posta em causa. Hoje em dia, a segurança alimentar dos produtos apresenta uma relevância significativa para consumidores, entidades regulamentares e, de uma forma geral, para todos os elos da cadeia alimentar. O controlo eficaz da higiene e da segurança alimentar é, deste modo, imprescindível na minimização de doenças e danos provocados pela deterioração dos alimentos. As consequências da falta deste controlo podem ir de desagradáveis a fatais. Adicionalmente, provocam perdas e custos e influenciam, negativamente, o comércio e a confiança dos consumidores. Os regulamentos (CE) n.º 852/2004 e n.º 853/2004, fiscalizados pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE - Portugal), exigem que os operadores do sector alimentar que realizem qualquer fase da produção, transformação e distribuição de alimentos, depois da produção primária e das operações associadas, possuam um sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP - *Hazards Analysis and Critical Control Points*), formalizado pelo *Codex Alimentarius Commission*, criado conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e pela Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*), que define as medidas a implementar para controlar os perigos alimentares.

O HACCP pretende evitar, com base em sistemas de prevenção, riscos que possam causar danos a consumidores através do consumo de alimentos que, por algum motivo, sejam prejudiciais à sua saúde. Para a implementação deste sistema, o *Codex Alimentarius* considera 7 princípios que devem ser considerados (ASAE, 2007):

1. Identificar os perigos e medidas preventivas;
2. Identificar os pontos críticos de controlo;
3. Estabelecer limites críticos para cada medida associada a cada PCC (ponto crítico de controlo);
4. Monitorizar/controlar cada PCC;
5. Estabelecer medidas corretivas para cada caso de limite em desvio;
6. Estabelecer procedimentos de verificação;
7. Criar sistemas de registo para todos os controlos efetuados.

A monitorização referida no ponto 4 e o registo dos dados obtidos, referido no ponto 7, traduz a necessidade das áreas de restauração realizarem verificações periódicas da temperatura e humidade relativa, no interior dos equipamentos de conservação de produtos alimentares, quer sejam equipamentos de refrigeração, quer de congelação. Para isso, existem já no mercado diversos dispositivos - *datalogger* - que monitorizam não só a temperatura como a humidade relativa do ar. No entanto, não existe ainda um dispositivo que, para além da monitorização da temperatura e da humidade relativa, calcule, através dos valores obtidos e de microbiologia preditiva, o crescimento bacteriano que afeta a qualidade e a deterioração dos alimentos presentes nos equipamentos de refrigeração. É pretendido, com esta dissertação, contribuir, nesta área, pelo desenvolvimento deste tipo de dispositivo.

## **1.2. O problema em estudo e a sua relevância**

Segundo a *European Commission* (2015), o desperdício alimentar na União Europeia pode atingir um valor de 120 milhões de toneladas em 2020, caso nada seja feito para o prevenir. Para evitar que esse valor seja atingido, foi criada a iniciativa “Save Food” que pretende juntar, em 2015, várias organizações e realizar conferências internacionais, onde serão definidas ações de controlo deste desperdício. A responsabilidade de diminuir este número parte de toda a cadeia de produtos alimentares, desde a sua produção até ao consumidor final, passando, em grande parte, pelo sector de restauração.

## **1.3. Objetivos e contribuição da dissertação**

Com esta dissertação, é pretendido criar um dispositivo de monitorização capaz de identificar quando é atingida a dose infetante de bactérias, para cada produto alimentar que se encontre num equipamento de refrigeração. Deste modo, é possível determinar, com alguma antecedência, quando o alimento se torna prejudicial à saúde e alertar o utilizador. Este estudo pretende estender as potencialidades dos atuais dataloggers (sistemas de monitorização de pontos críticos de controlo), utilizados no controlo da segurança alimentar determinada pelos sistemas HACCP. Este aparelho tem como objetivo avisar o utilizador que deve consumir um determinado produto alimentar antes de ser atingida a dose infetante que provoca a deterioração do mesmo e põe em risco a segurança alimentar. Adicionalmente, é também possível a redução do desperdício alimentar provocado pelos produtos que seriam deitados fora devido a uma exposição prolongada dentro de um equipamento de refrigeração.



## **1.4. Visão geral e organização da dissertação**

A dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos:

No capítulo introdutório, é descrito o problema em causa e a solução apresentada para o resolver, ou minimizar, assim como a importância de criar um dispositivo de monitorização do crescimento bacteriano, ao invés de se limitar a uma monitorização da temperatura a que se encontram os produtos alimentares.

No segundo capítulo, “Estado da Arte”, é explicado o princípio no qual o dispositivo se baseia para prever a deterioração dos produtos alimentares - crescimento microbiano.

No capítulo seguinte, são determinados os fatores que permitem calcular a curva de crescimento de diferentes bactérias. É também feito o relato do procedimento experimental realizado na construção do dispositivo, tanto a nível de hardware como a nível da programação do microcontrolador e da interface gráfica desenvolvida.

A análise e discussão de resultados é realizada no capítulo 4, em que são descritos os vários testes efetuados e os resultados obtidos, tanto a nível do dispositivo criado, como para demonstrar a influência de diferentes fatores na curva de crescimento bacteriano.

Cada um dos capítulos anteriores é principiado com uma breve introdução e finalizado com uma conclusão específica do capítulo.

A conclusão da dissertação tem lugar no último capítulo, onde é feita uma avaliação geral da mesma e as sugestões de como melhorar o dispositivo em trabalhos futuros.

## 2. Estado da Arte

### 2.1. Introdução

Neste capítulo, é feita uma contextualização dos temas abordados ao longo da dissertação, com especial atenção para a influência de bactérias como principais responsáveis pela deterioração de produtos alimentares, assim como para o crescimento bacteriano e para as condições que o promovem.

Para o desenvolvimento deste capítulo, foi essencial o modelo matemático desenvolvido por Baranyi & Roberts (1994) e a aplicação deste modelo na criação da ferramenta computacional online: *ComBase - Combined Database for Predictive Microbiology* (ComBase, 2015). Sem a consulta destas referências, não seria possível obter as conclusões relativas ao crescimento bacteriano obtidas nesta dissertação.

É também importante referir todos os trabalhos de investigação científica, de cariz experimental ou numérico, que de algum modo forneceram dados referentes ao meio em que cada bactéria se desenvolve (multiplicação), como a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ), o pH e a atividade de água ( $a_w$ ), nomeadamente o trabalho realizado por Gaspar *et al.* (2009), onde foi feita uma análise do crescimento bacteriano em diferentes condições de conservação.

### 2.2. Segurança alimentar

Para falar em segurança alimentar, é preciso perceber o que causa a deterioração dos alimentos e os torna prejudiciais para a saúde, assim como as condições em que isso acontece. A resposta baseia-se nas bactérias presentes nos alimentos e no seu crescimento. À partida, uma dose inicial de unidades formadoras de colónias de uma determinada bactéria, por grama (UFC/g), não é prejudicial à saúde. Considera-se que o alimento em causa não provoca um perigo para a saúde até que seja atingido o valor correspondente à dose infetante de UFC/g.

#### 2.2.1. Fatores intrínsecos e extrínsecos

Cada bactéria se desenvolve a um ritmo diferente e perante condições diferentes. Essas condições dividem-se em fatores intrínsecos e extrínsecos. Tal como o nome indica, os fatores intrínsecos são aqueles que dependem do alimento em causa como, por exemplo, a  $a_w$ , o pH, o potencial de oxidação/redução (Eh), a composição química e estrutura biológica do alimento e

as substâncias anti-microbianas naturais presentes no alimento. Os fatores extrínsecos apenas dependem do ambiente exterior ao alimento, isto é, a temperatura, a humidade relativa e a composição do meio (Gaspar *et al.*, 2009). Embora todos estes fatores contribuam para o crescimento microbiano, serão apenas considerados o pH, a atividade de água e a temperatura, uma vez que são os que se consideram mais importantes (FDA, 2012) e os que estão diretamente envolvidos no modelo matemático utilizado.

### **Atividade de água ( $a_w$ )**

A atividade de água é um dos fatores mais importantes no crescimento bacteriano, uma vez que ambientes aquosos são propícios para o desenvolvimento de bactérias (Gaspar *et al.* 2009). O seu valor é calculado pela razão entre a pressão parcial de vapor de água da substância e a pressão do vapor de água saturado à mesma temperatura, conforme Equação (1).

$$a_w = \frac{p_v}{p_{vs}} \quad (1)$$

Uma expressão semelhante é utilizada para a humidade relativa, calculada a partir da razão entre a pressão parcial do vapor de água no ar e a pressão do vapor de água saturado. Para alimentos que se encontrem num sistema isolado, a humidade relativa do ar entra em equilíbrio com os alimentos lá presentes (humidade relativa em equilíbrio - ERH). É então considerada equivalente à atividade de água conforme indicado na Equação (2).

$$a_w = \frac{ERH}{100} \quad (2)$$

No entanto, esta expressão não será utilizada para calcular a atividade de água dos alimentos em estudo, uma vez que esses alimentos se encontram muitas vezes embalados, o que os torna isolados do ambiente do equipamento de refrigeração, onde é medida a humidade relativa. Deste modo, os valores a serem considerados, para cada género alimentar, são apresentados na Tabela 1 (Chirife *et al.*, 1989; Food Tech Source, 2002; CVO/Food Safety Knowledge Centre, 2015).

Tabela 1. Valores da atividade de água para diferentes alimentos.

Alimento	Atividade de Água ( $a_w$ )
Carnes	0.99
Leite	0.97
Mayonnaise	0.93
Ovos	0.97
Queijos	0.91
Peixes	0.95
Vegetais	0.95

**Potencial de hidrogénio (pH)**

O pH é também um fator importante no desenvolvimento de bactérias. Cada microrganismo tem um pH ótimo, no qual a sua multiplicação é máxima. Tanto o aumento como a diminuição do pH, em relação ao valor de pH ótimo, torna o crescimento mais lento.

Na Tabela 2, é apresentado o pH de alguns dos alimentos segundo FDA (2012), tendo sido selecionados aqueles que podem ser analisados com o dispositivo criado nesta dissertação. Estes valores serão, posteriormente, utilizados para calcular o crescimento das bactérias responsáveis pela deterioração de cada um dos alimentos apresentados.

Tabela 2. Valores de pH para diferentes alimentos.

Alimento	pH
Carne	
Aves	6.5-6.7
Porco	5.3-6.9
Vaca	5.8
Lacticínios	
Leite	6.3-8.5
Mayonnaise	4.2-4.5
Ovos	7.1
Queijo camembert	7.4
Queijo cremoso	4.88
Queijo (outros)	5.6
Peixe	
Atum	5.2-6.1
Camarão	6.8-7.0
Caranguejo	7.0
Ostras	4.8-6.3
Peixe Fresco	6.6-6.8
Produtos Hortícolas	
Alface	5.8-6.0
Batata	6.1
Tomate	4.2-4.9

### 2.2.2. Bactérias estudadas

Em FDA (2012), é possível verificar que são muitos os organismos responsáveis pela deterioração de alimentos, podendo estes ser bactérias, vírus, parasitas ou toxinas. Nesta dissertação, apenas será prevista a deterioração causada por bactérias, mais especificamente pelas 14 bactérias que se seguem:

- *Aeromonas hydrophila*;
- *Bacillus cereus*;
- *Bacillus licheniformis*;
- *Bacillus subtilis*;
- *Clostridium botulinum*;
- *Clostridium perfringens*;
- *Escherichia coli*;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Salmonella*;
- *Shigella flexneri*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Yersinia enterocolitica*;
- *Brochothrix thermosphacta*;
- *Pseudomonas*.

A razão para esta escolha deve-se a serem estas as bactérias apresentadas em ComBase, o que permite calcular as suas curvas de crescimento, como será demonstrado em 3.2. Destas 14 bactérias, apenas duas não estão relacionadas com algum dos alimentos apresentados na Tabela 2, a *Bacillus licheniformis* e a *Bacillus subtilis*. Todas as restantes foram já detetadas nos alimentos apresentados (Franzetti & Scarpellini, 2007; FDA, 2012; Arrow scientific, 2013). De seguida, é feita uma pequena descrição dos sintomas causados por cada uma destas bactérias (Gaspar *et al.*, 2009; FDA, 2012):

### ***Aeromonas hydrophila***

Esta bactéria é essencialmente encontrada em peixes e mariscos, apesar de também ser encontrada em carnes. A ingestão de alimentos contaminados com esta bactéria pode provocar diarreia, que na maior parte dos casos desaparece, por si só, em poucos dias.

### ***Bacillus cereus***

Os efeitos provocados por esta bactéria incluem diarreia, dor abdominal e náuseas (usualmente sem vômitos). Estes efeitos, tanto podem demorar meia hora a ter início, como entre 6 a 15 horas, embora desapareçam, aproximadamente, num dia, em ambos os casos. O desenvolvimento de *B. cereus* pode ser encontrado em inúmeras comidas como carnes, peixe, leite e vegetais.

### ***Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis***

Ambas as bactérias se relacionam com a bactéria *B. cereus*, uma vez que se inserem na mesma espécie. Os efeitos são semelhantes aos já indicados para *B. cereus*, com a particularidade de estas duas bactérias apenas se desenvolverem em temperaturas acima de 10°C.

### ***Clostridium botulinum***

O botulismo não é uma doença muito comum e tem origem na contaminação provocada por esta bactéria. A ingestão pode provocar apenas náuseas e vômitos, mas, em casos severos de botulismo, os sintomas podem ir da fadiga extrema, fraqueza, problemas de visão e descoordenação de movimentos, até à paragem cardíaca e respiratória. A bactéria tem a capacidade de se desenvolver em locais com pouco oxigénio, como produtos enlatados, o que a relaciona com o atum em lata. A falta de sinais de deterioração na comida contaminada é um fator que torna esta bactéria perigosa.

### ***Clostridium perfringens***

A ingestão desta bactéria, através de produtos alimentares, pode provocar gastroenterites. Dependendo da severidade com que se é infetado, os sintomas tanto podem ser diarreia e dor abdominal como, em casos mais raros, cólicas, diarreia intensa, distensão por gases, desidratação e choque. Este segundo caso pode levar à morte. Apesar de também se desenvolver em comidas cruas, como vegetais, é essencialmente atribuída a carne de aves e de vaca.

***Escherichia coli***

Esta bactéria é dividida em quatro categorias: *E. coli* enteropatogénica clássica (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasora (EIEC) e enterohemorrágica (EHEC). Pode provocar diarreias, em alguns casos severos, febre, náuseas, vômitos e cólicas. É muito relacionada com falta de condições de higiene, mas a nível de alimentação está presente em carne de vaca e leite.

***Listeria monocytogenes***

Reconhecida como perigo para a saúde pública nos Estados Unidos, a *L. monocytogenes* é uma das principais causas de morte por intoxicação alimentar. A sua forma não invasiva provoca distúrbios gastrointestinais leves, como náuseas, vômitos e diarreia. A forma invasiva é mais letal e afeta, em especial, grávidas e pessoas com o sistema imunitário debilitado. Das bactérias analisadas, é uma das que mais se manifesta em alimentos, como, por exemplo, carnes, peixes e marisco, leite e derivados (nomeadamente queijos) e vegetais.

***Salmonella***

A *Salmonella* pode provocar náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, febre e dor de cabeça. Em pessoas saudáveis, estes sintomas usualmente desaparecem por si só. No entanto, as espécies *S. enteritidis*, *S. typhimurium* e *S. newpoort* podem levar à morte se não houver tratamento com antibióticos. Esta bactéria pode contaminar diversos produtos alimentares como carnes, ovos, frutos e vegetais.

***Shigella flexneri***

Esta bactéria é caracterizada por ter uma dose infetante de apenas 100 UFC/g. Os sintomas incluem dor abdominal, cólicas, diarreia, febre e vômitos e ocorrem quando é ingerida comida ou água contaminada com fezes, o que torna fácil a sua transmissão em locais com falta de cuidados de higiene. As comidas cruas são as mais afetadas, como as saladas e os alimentos que as compõem (batata, atum, frango). Também o leite e derivados são associados a infeções desta bactéria.

***Staphylococcus aureus***

Está relacionada com náuseas, vômitos intensos, diarreia e dor abdominal. Em casos mais graves, pode provocar desidratação, dores de cabeça, câibras musculares e alterações temporárias na pressão do sangue e batimento cardíaco. Desenvolve-se em carnes e produtos derivados de carne, ovos, atum, frango, batatas, leite e derivados.

***Yersinia enterocolitica***

Os sintomas provocados pela ingestão desta bactéria podem ser febre, dores abdominais, diarreia e vômitos e está relacionada com carnes de porco e vaca, assim como peixe fresco e marisco. O leite é também um dos produtos onde a bactéria se desenvolve, apesar de afetar principalmente o leite não aquecido - não pasteurizado.

***Brochothrix thermosphacta***

Esta bactéria tem um papel fundamental na deterioração da carne, uma vez que, ao contrário da grande maioria das bactérias referidas até agora, dá origem a odores do tipo levedura, perda de sabor, descoloração e libertação de gases. É, por isso, associada aos vários tipos de carnes.

***Pseudomonas***

Tal como a *B. thermosphacta*, também a *Pseudomonas spp.* tem efeito na deterioração da carne, provocando odores, perda de sabor, descoloração e presença de compostos voláteis. Para além de ser associada às carnes, é também responsável pela deterioração de produtos como peixe fresco e leite.

Na Tabela 3, encontra-se um resumo dos alimentos nos quais foram relatadas infeções com cada uma das bactérias acima descritas.



Tabela 3. Bactérias responsáveis pela deterioração de cada alimento.

Alimento infetado  Microrganismo	Carne			Peixe			Produtos hortícolas		Lacticínios		
	Aves	Porco	Vaca	Atum	Marisco	Peixe fresco	Batata	Vegetais	Leite	Produtos derivados de leite	Ovos
<i>Aeromonas hydrophila</i>	X	X	X		X	X					
<i>Bacillus cereus</i>	X	X	X			X		X	X		
<i>Clostridium botulinum</i>	X			X	X						
<i>Clostridium perfringens</i>	X		X								
<i>Escherichia coli</i>			X							X	
<i>Listeria monocytogenes</i>	X	X	X		X	X		X	X	X	
<i>Salmonella</i>	X	X	X		X	X		X	X	X	X
<i>Shigella flexneri</i>	X			X	X		X	X	X	X	
<i>Staphylococcus aureus</i>	X	X	X	X			X		X	X	X
<i>Yersinia enterocolitica</i>		X	X		X	X			X		
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	X	X	X								
<i>Pseudomonas</i>		X	X			X			X		

## 2.3. Modelo matemático da curva de crescimento

### 2.3.1. Modelo de crescimento microbiano

Como referido anteriormente, cada bactéria desenvolve-se a um ritmo diferente e em condições distintas. O crescimento bacteriano é a reprodução assexual, ou a divisão celular, de uma bactéria em duas células filhas, por um processo denominado de fissão binária. Assim, é possível que em condições ideais a "duplicação local" da população bacteriana ocorra, assistindo-se a um crescimento exponencial (Science Encyclopedia, 2015). Um mesmo modelo matemático, e consequentemente a mesma curva de crescimento, reflete os resultados experimentais. Esta curva é representada na

Figura 2, onde se encontram as 4 principais fases de crescimento: latência, crescimento exponencial, estabilização e decréscimo. A última fase (decrécimo ou morte celular) não será considerada, uma vez que apenas existe interesse em determinar quando é atingida a dose infetante de cada bactéria, algo que acontece durante a fase de crescimento exponencial.

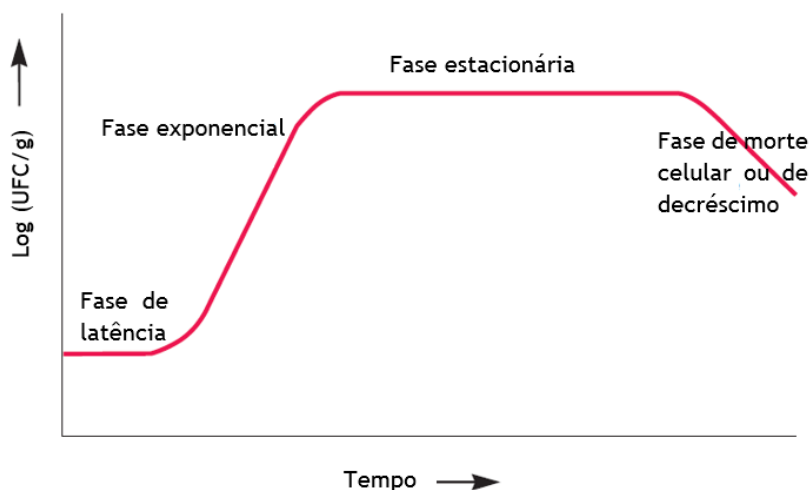


Figura 2 - Curva de crescimento bacteriano (Willey *et al.*, 2009).

O desenvolvimento bacteriano não tem um crescimento imediato, pois a bactéria demora algum tempo a adaptar-se ao meio. Esse tempo é denominado tempo de latência (*lag*) e é representado por  $\lambda$ , o que dá o nome à primeira fase apresentada - fase de latência (Willey *et al.*, 2009).

Após ser atingido o período de adaptação, o crescimento da bactéria torna-se exponencial e o declive da curva de crescimento atinge o seu valor máximo, que se mantém aproximadamente até ao final da segunda fase de crescimento - fase exponencial. É nesta fase que se revela que o crescimento difere entre bactérias e em diferentes ambientes, representados por diferentes temperaturas, pH e atividade de água. Cada uma destas características altera o valor máximo do declive da curva de crescimento, sendo este declive representado por  $\mu_{\max}$ .

Com a aproximação do valor de saturação, o declive da curva de crescimento diminui até ser nulo. A partir desse momento, começa a maior das 4 fases referidas - fase estacionária. Esta fase deve-se a um limite de crescimento causado pelo esgotamento de nutrientes e/ou produtos que inibem o desenvolvimento bacteriano, como ácidos orgânicos (Widdel, 2010).

A última fase é muitas vezes ignorada e considera-se que o crescimento acaba com a fase de estabilização. No entanto, é possível ver no gráfico da Figura 2 que, após bastante tempo, algumas das células começam a morrer, diminuindo assim o valor de UFC/g - fase de morte celular ou de decréscimo.

### 2.3.2. Origem do modelo matemático da curva de crescimento

Gompertz (1825) desenvolveu a Equação (3) que permite determinar a taxa de mortalidade humana, onde 'L' se refere ao número de pessoas vivas na idade 'x'.

$$L_x = kg^{c^x} \quad (3)$$

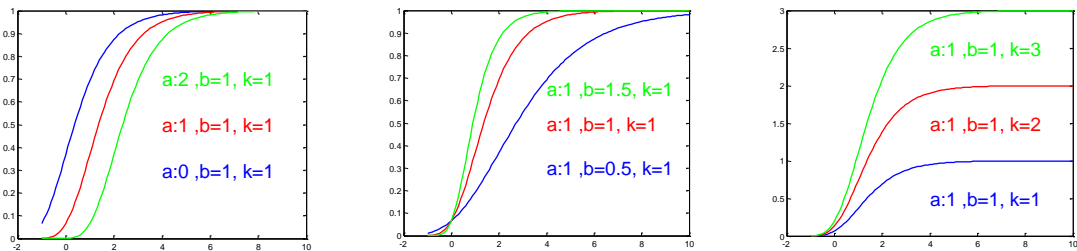
Como descrito por Winsor (1932), esta equação passou a ser também utilizada por biólogos e economistas, como sendo uma curva de crescimento. Começou também a ser escrita numa forma alternativa:

$$y = ke^{-e^{a-bx}} \quad (4)$$

onde é possível verificar:

$$\begin{cases} \lim_{x \rightarrow -\infty} y = 0 \\ \lim_{x \rightarrow \infty} y = k \end{cases} \quad (5)$$

Na Equação (4), a constante ‘a’ está relacionada com o valor de x no qual começa o crescimento da curva (ver Figura 3a); a constante ‘b’ representa o declive da curva (ver Figura 3b); e a constante ‘k’ o valor máximo de y onde a equação estabiliza (ver Figura 3c).



(a) Influência da const. ‘a’.      (b) Influência da const. ‘b’.      (c) Influência da const. ‘k’.

Figura 3 - Influência dos parâmetros da equação de crescimento na curva de Gompertz.

Baranyi et al. (1993) e Baranyi & Roberts (1994) basearam-se no modelo de Gompertz para criar um modelo de crescimento bacteriano que representasse a evolução de uma bactéria ao longo do tempo. A Equação (6) representa este modelo e será descrita detalhadamente em 2.3.3.

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left( e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0} \right) + \dots$$

$$\dots - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{\frac{m\mu_{max}t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})}{m}} - 1}{e^{m(y_{max} - y_0)}} \right) \quad (6)$$

Whiting (1995) dividiu os modelos de previsão microbiológica em três níveis: modelos primários, modelos secundários e modelos terciários. Os modelos primários são aqueles que descrevem as alterações do número de células das bactérias ao longo do tempo, sendo o modelo de Baranyi & Roberts (1994) (Equação 6) um dos mais utilizados. Os modelos secundários incluem a relação entre o crescimento bacteriano e as condições a que a bactéria está sujeita (como a temperatura, o pH e a atividade de água). Considera-se que os modelos terciários são aqueles que agrupam os outros dois modelos.

### 2.3.3. Modelo de Baranyi e Roberts

Após ser demonstrada a curva de desenvolvimento de uma bactéria e o modelo matemático que lhe é semelhante, é possível encontrar uma relação entre eles, mais especificamente definir como cada variável da Equação (6) influencia a curva de crescimento da Figura 1. Essa relação pode ser observada na Figura 4 (Baranyi, 2010).

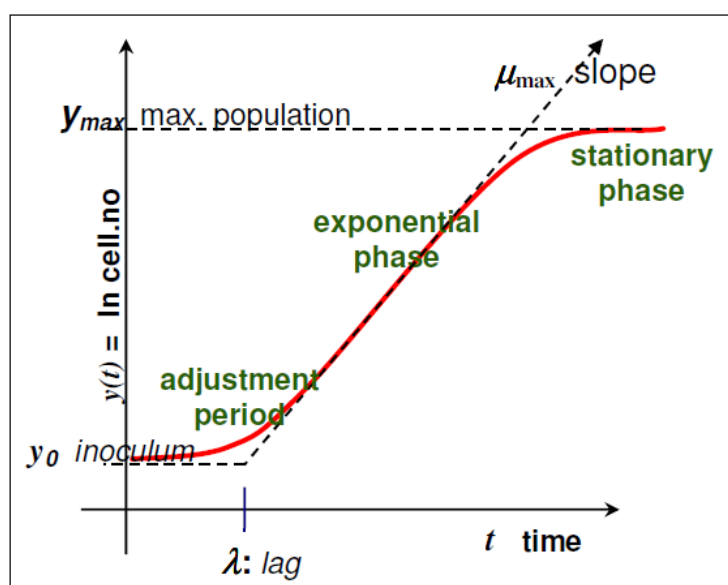
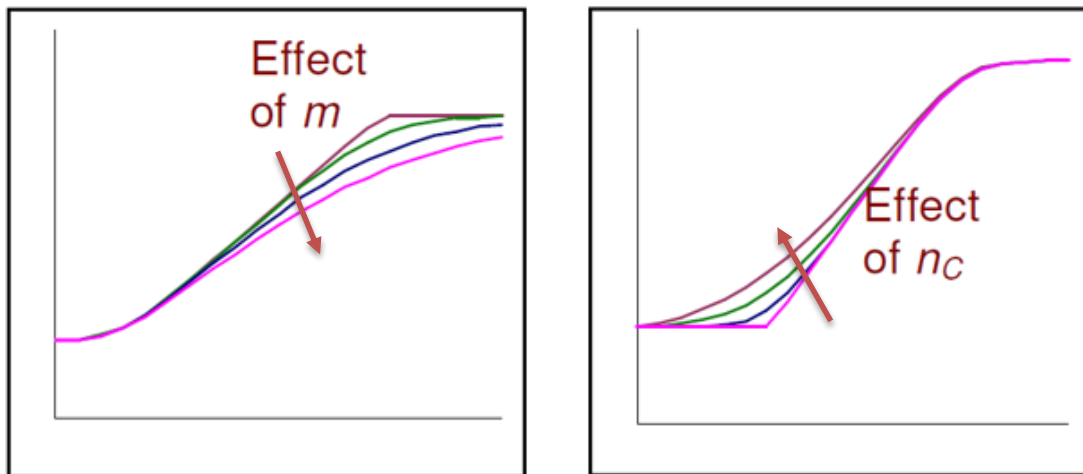


Figura 4 - Relação entre a curva de crescimento e as variáveis do modelo de Baranyi e Roberts (Baranyi, 2010).

Na Equação (6) são utilizadas oito variáveis (Grijpspeerdt & Vanrolleghem, 1999; Baranyi, 2010):

- $y(t)$  é equivalente a  $\ln(x(t))$  onde  $x(t)$  é o número de UFC/g;
- $y_0$  é a concentração inicial de UFC/g (em valor logarítmico) e o seu valor é definido para cada bactéria na Tabela 13;
- $y_{max}$  é a concentração máxima de UFC/g (em valor logarítmico) e tal como  $y_0$  tem o seu valor definido na Tabela 13;
- $\mu_{max}$  é o declive máximo da curva de crescimento, o seu valor está relacionado com os fatores intrínsecos e extrínsecos em que a bactéria se desenvolve;
- $h_0$  é uma constante definida por  $h_0 = -\ln(\alpha_0)$ , onde  $\alpha_0$  é chamado *physiological state*; Está também relacionada com o valor de  $\lambda$ , apresentado na Figura 4, em que  $\lambda = \frac{h_0}{\mu_{max}}$ ;
- $m$  é o parâmetro que define a curvatura entre a fase exponencial e a fase estacionária (Figura 5);
- $n_c$  é o parâmetro que define a curvatura entre a fase inicial e a fase exponencial através da equação  $n_c = \frac{v}{\mu_{max}}$  (Figura 5);
- $t$  é o tempo decorrido desde que começa a evolução da bactéria.



(a) Efeito de  $m$ .

(b) Efeito de  $n_c$ .

Figura 5 - Efeito de parâmetros seleccionados na transição entre as fases da curva de crescimento (Baranyi, 2010).

## **2.4. Nota conclusiva**

Neste capítulo, foram apresentados os produtos alimentares que serão considerados nos próximos capítulos, assim como as bactérias responsáveis pela sua deterioração, uma pequena descrição sobre cada uma delas, e os valores de pH e  $a_w$  que correspondem a cada alimento.

Foi também possível perceber a evolução e o ponto de situação referente ao modelo que representa o crescimento bacteriano, um tema que tem vindo a ser desenvolvido nas últimas décadas e que está em constante atualização.

Na fase final, foi representado o modelo de Baranyi & Roberts (1994) que será simplificado no próximo capítulo.

## 3. Protótipo experimental

### 3.1. Introdução

Numa primeira parte deste capítulo, são determinados os coeficientes que permitem calcular o declive máximo da curva de crescimento de cada uma das bactérias consideradas no capítulo anterior. A obtenção destes coeficientes torna possível a utilização da expressão matemática simplificada decorrente do modelo de Baranyi & Roberts (1994), uma vez que todas as suas variáveis ficam assim calculadas.

Com a finalidade de testar a expressão matemática obtida e visualizar as curvas de crescimento para várias bactérias sujeitas a diferentes ambientes, foi criado um interface gráfico a partir da ferramenta *GUI (Graphical User Interfaces)* do Matlab. Neste interface, o utilizador seleciona a bactéria que pretende analisar e os parâmetros que caracterizam o ambiente onde esta se encontra, sendo devolvida a curva de crescimento para essas condições.

Numa fase posterior do capítulo é descrito o circuito eletrónico e o programa que compõem o dispositivo que, para além de monitorizar a temperatura e a humidade relativa do ar de um equipamento de refrigeração, também alerta o utilizador quando algum dos alimentos dispostos nesse equipamento atingiu um nível de deterioração que o torne prejudicial à saúde. Para tal, foi utilizado o microcontrolador PIC16F1716 da MicroChip, juntamente com o sensor AM2302 de temperatura e humidade relativa da Aosong.

Ao dispositivo, encontra-se também associado um interface gráfico, que permite visualizar os gráficos relativos às medições efetuadas, assim como dar a oportunidade ao utilizador de seleccionar os alimentos que pretende analisar.

### 3.2. Simplificação do modelo de Baranyi & Roberts

Na secção 2.3.3 foi descrito o modelo de Baranyi & Roberts (1994) representado na Equação (6) constituída por 8 variáveis. Todavia, é possível simplificar a equação após substituição de alguns parâmetros por valores que tornam o modelo mais exclusivo para os objetivos desta dissertação.

As variáveis, logaritmo do número de UFC/g,  $y(t)$ , e o tempo,  $t$ , são obviamente necessárias na equação e impossíveis de simplificar. Os valores logarítmicos da concentração inicial de UFC/g,  $y_0$ , e da concentração máxima de UFC/g,  $y_{max}$ , apenas dependem da bactéria a considerar e os seus valores encontram-se na Tabela 13, logo também se mantêm inalterados, assim como o declive máximo da curva de crescimento,  $\mu_{max}$ , cuja fórmula será explorada na secção 3.2.2.



Tal como já referido, a constante  $h_0$ , valor logarítmico do estado fisiológico, encontra-se relacionada com o tempo de latência (*lag*). O dispositivo a ser criado tem como principal finalidade determinar o número de UFC/g em produtos alimentares mantidos num equipamento de refrigeração, localizados em áreas de restauração como cantinas, bares, cafés e restaurantes. Os equipamentos de congelação não serão considerados uma vez que as bactérias escolhidas para o estudo deste dispositivo não se desenvolvem em ambientes inferiores a  $-1^{\circ}\text{C}$ . Quando os produtos alimentares são adquiridos por estes estabelecimentos, existe já um histórico no crescimento de bactérias que, apesar de tentar ser controlado ao máximo, é inevitável e quase impossível de calcular. Este histórico tem início na colheita, para o caso de um produto vegetal, ou abate, no caso de um produto animal, do produto alimentar e é agravado durante a sua transformação (se for o caso), transporte e distribuição. Durante este período, os alimentos são sujeitos a diferentes temperaturas que permitem o desenvolvimento de bactéria (ver Figura 6).

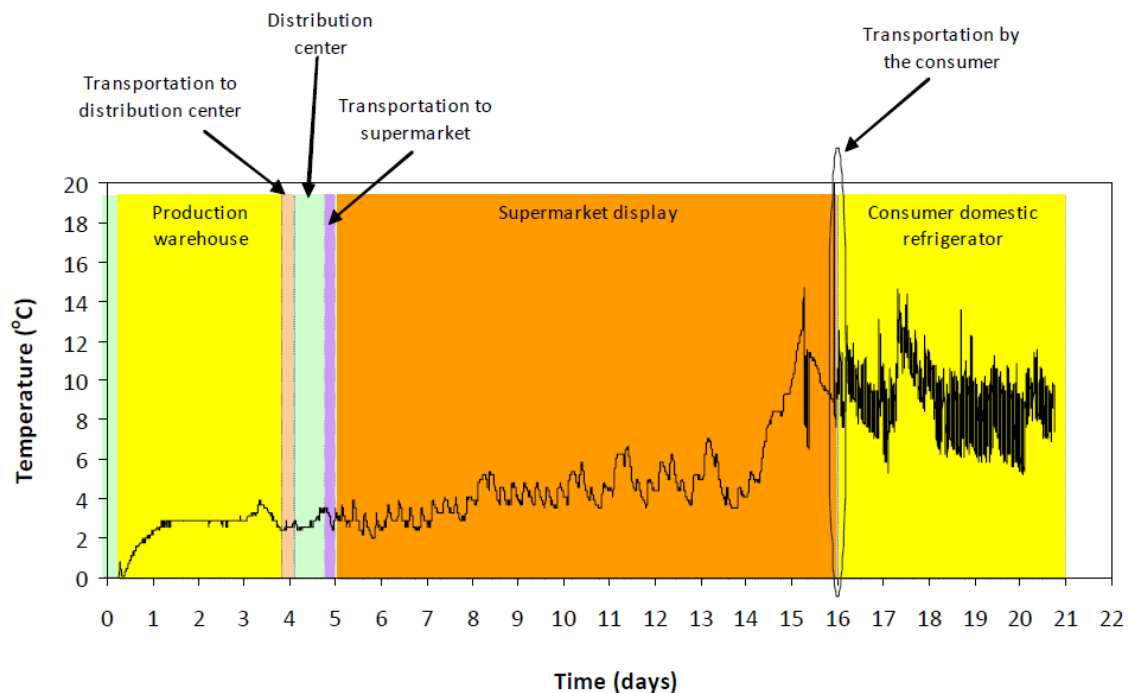


Figura 6 - Relação tempo/temperatura para fatias de presunto de peru entre a fase de produção e o consumidor (Gogou *et al.*, 2014).

Por exemplo, um produto animal comprado numa grande superfície, como um hipermercado, no momento em que chega às mãos do consumidor já possui um número de bactérias que tem vindo a crescer desde que o animal foi abatido no matadouro. Uma vez que se torna impossível controlar este crescimento através de microbiologia preditiva, a aproximação utilizada será considerar o período de latência (*lag*) inexistente, isto é, no momento em que o produto começar

a ser analisado é considerado que o crescimento começa de imediato. Deste modo, a constante  $h_0 = 0$ , uma vez que:

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{max}} \quad (7)$$

Como não existe latência (*lag*), o parâmetro que define a curvatura entre a fase inicial e a fase exponencial,  $v$ , também pode ser desprezado, visto que:

$$n_c = \frac{v}{\mu_{max}} \quad (8)$$

Onde  $n_c = 0$ .

O parâmetro que define a curvatura entre a fase exponencial e a fase estacionária,  $m$ , foi variado até encontrar o valor para o qual o erro da curva obtida fosse mínimo, comparativamente aos gráficos obtidos a partir da ferramenta *ComBase Predictor*. Dos valores testados, aquele que proporcionou melhores resultados foi  $m = 2$ .

Em resumo, os valores a substituir na Equação (6) são:

$$\begin{cases} h_0 = 0 \\ v = 0 \\ m = 2 \end{cases}$$

O que permite simplificar a Equação (6):

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0}) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu_{max}t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0})} - 1}{e^{m(y_{max}-y_0)}} \right)$$

$$\text{Após simplificação} \Rightarrow y(t) = y_0 + \mu_{max}t - \frac{1}{2} \ln \left( 1 + \frac{e^{2\mu_{max}t} - 1}{e^{2(y_{max} - y_0)}} \right) \quad (9)$$

A Equação (9) é apresentada como sendo a que vai ser utilizada, durante a dissertação, para determinar o crescimento microbiano.

### 3.2.1. Determinação do declive máximo de crescimento

O declive máximo do crescimento microbiano,  $\mu_{max}$ , representa, na curva de crescimento, como os fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam o desenvolvimento de uma determinada bactéria.

Existem vários modelos que relacionam o  $\mu_{max}$  com a temperatura,  $T$ , com o pH e com a atividade de água ( $a_w$ ). Nesta dissertação, será utilizado o modelo proposto por Masana & Baranyi (2000), apresentado na Equação (10):

$$\begin{aligned} \ln(\mu_{max}) = & a_0 + a_1T + a_2pH + a_3b_w + a_4T.pH + ... \\ & ... + a_5T.b_w + a_6pH.b_w + a_7T^2 + a_8pH^2 + a_9b_w^2 \end{aligned} \quad (10)$$

Onde  $a_i$  são coeficientes a serem estimados,  $T$  e pH são respetivamente os valores da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e do pH (Gibson *et al.*, 1994):

$$b_w = \sqrt{1 - a_w} \quad (11)$$

#### Calculo dos coeficientes do declive máximo de crescimento ( $\mu_{max}$ )

Para estimar os coeficientes, foi utilizada a ferramenta online *ComBase Predictor* (ComBase, 2015) onde é possível obter o valor do declive máximo, assim como o gráfico correspondente, para uma bactéria que se encontre num ambiente descrito pelos fatores escolhidos. Um exemplo desta ferramenta pode ser visualizado na Figura 7, onde é analisado o crescimento da bactéria *Aeromonas hydrophila* quando se encontra num ambiente a uma temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , com um pH igual a 7 e com uma atividade de água de 0.997. Nestas condições, o declive máximo obtido é  $\mu_{max} = 0.433$ .

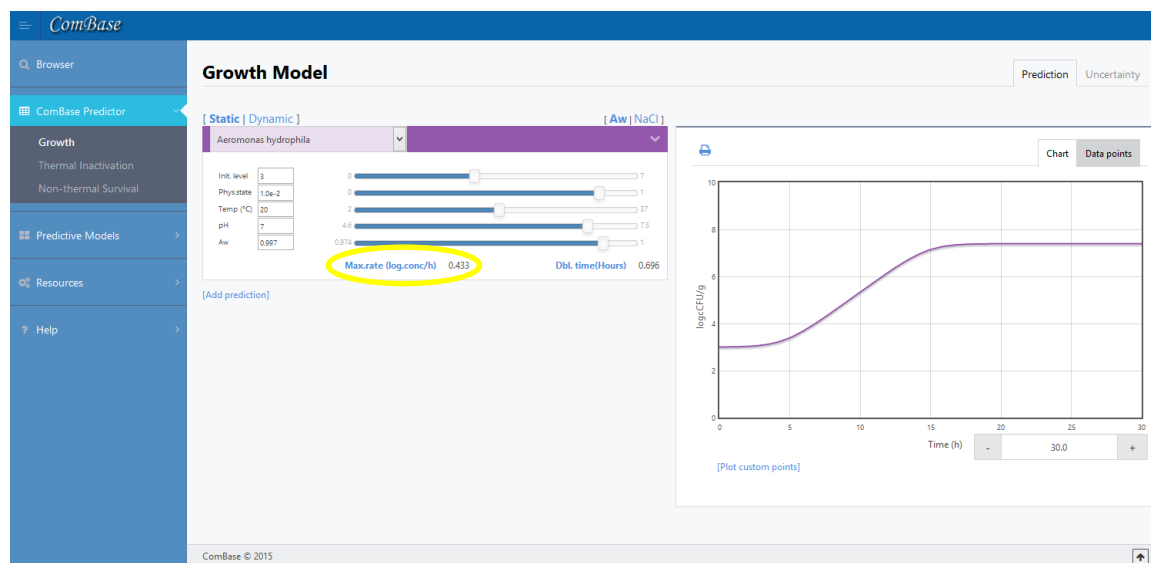


Figura 7 - Exemplo da ferramenta *ComBase Predictor* para a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Com este método é possível estimar os coeficientes  $a_i$  para cada bactéria. Como exemplo, será feita esta estimativa para a bactéria *Brochothrix thermosphacta*, sendo que para todas as outras bactérias o procedimento de cálculo é semelhante. Para isso, é construída uma tabela com diferentes valores de temperatura,  $T$ , potencial de hidrogénio, pH, e atividade de água,  $a_w$  (e consequentemente  $b_w$ ) e é verificado qual é o valor do declive máximo,  $\mu_{max}$ , correspondente para essas condições (Tabela 4).

Tabela 4. Declive máximo para diferentes valores de temperatura,  $T$ , potencial de hidrogénio, pH, e atividade de água,  $a_w$ , para a bactéria *Brochothrix thermosphacta*.

Input			
$T$ [°C]	pH	$a_w$	$\mu_{max}$
1	5.5	0.95	0.012
1	6.25	0.975	0.027
1	7	0.95	0.011
15	5.5	1	0.132
15	6.25	1	0.247
30	5.5	0.95	0.028
30	6.25	0.95	0.061
30	7	0.95	0.066
30	7	0.975	0.145
30	7	1	0.313

A partir destes valores é elaborada uma outra tabela (Tabela 5), onde são apresentados os fatores de  $a_i$ . Esta tabela será utilizada como uma matriz (matriz A) com 10 linhas e 10 colunas. Uma outra matriz (matriz B) com 10 linhas e 1 coluna é composta pelos vários valores de  $\ln(\mu_{max})$  e encontra-se também representada na Tabela 5.

Tabela 5. Matriz A e Matriz B para a bactéria *Brochothrix thermosphacta*, sendo utilizados os valores base da Tabela 4.

Matriz A										Matriz B
	$T$	pH	$b_w$	$T \cdot \text{pH}$	$T \cdot b_w$	$\text{pH} \cdot b_w$	$T^2$	$\text{pH}^2$	$b_w^2$	$\ln(\mu_{max})$
1	1	5.5	0.223607	5.5	0.2236068	1.229837388	1	30.25	0.05	-4.42285
1	1	6.25	0.158114	6.25	0.1581139	0.988211769	1	39.0625	0.025	-3.61192
1	1	7	0.223607	7	0.2236068	1.565247584	1	49	0.05	-4.50986
1	15	5.5	0	82.5	0	0	225	30.25	0	-2.02495
1	15	6.25	0	93.75	0	0	225	39.0625	0	-1.39837
1	30	5.5	0.223607	165	6.7082039	1.229837388	900	30.25	0.05	-3.57555
1	30	6.25	0.223607	187.5	6.7082039	1.397542486	900	39.0625	0.05	-2.79688
1	30	7	0.223607	210	6.7082039	1.565247584	900	49	0.05	-2.7181
1	30	7	0.158114	210	4.7434165	1.106797181	900	49	0.025	-1.93102
1	30	7	0	210	0	0	900	49	0	-1.16155

As matrizes A e B servirão para calcular os coeficientes  $a_0$  a  $a_9$  pela resolução do sistema de equações lineares:

$$[A][a_i] = [B] \quad (12)$$

Utilizando as matrizes A e B da Tabela 5, fica representado um sistema de 10 equações e 10 incógnitas, de onde é possível obter os valores apresentados na Tabela 6. Estes valores são uma estimativa que, quando aplicados na Equação (10), permitem calcular o valor do declive máximo para qualquer temperatura, pH e atividade de água, a que se encontre a bactéria a partir da qual foi feita a estimativa, neste caso a bactéria *Brochothrix thermosphacta*. Uma vez que estes valores são obtidos a partir de uma estimativa, quando comparados com o *Combase Predictor* existe um pequeno erro associado. Na Tabela 7, é apresentado o erro obtido para diferentes ambientes obtidos aleatoriamente.

Tendo em conta que os valores escolhidos para estimar os coeficientes  $a_i$  foram aqueles com que se obtinha um menor erro, foi utilizado o mesmo método para construir a Tabela 8. Nessa tabela encontram-se os coeficientes estimados para as bactérias apresentadas no capítulo 2.2.2.

Tabela 6. Valores de  $a_i$  para a bactéria *Brochothrix thermosphacta*, sendo utilizados os valores base da Tabela 4.

$a_i$	Valor
$a_0$	-28.3244
$a_1$	0.0976
$a_2$	7.8197
$a_3$	8.0746
$a_4$	0.0217
$a_5$	-0.1346
$a_6$	-0.5496
$a_7$	-0.0051
$a_8$	-0.6221
$a_9$	-31.9812

Tabela 7. Erro no cálculo de  $\mu_{\max}$  pela utilização dos valores estimados de  $a_i$ .

Input				$\mu_{\max}$		
$T$ [°C]	pH	$a_w$	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$ (estimado)	Erro absoluto	Erro relativo
4.65	5.7	0.960	0.031	0.0313837	$3.837 \times 10^{-4}$	1.2%
17.00	6.8	0.962	0.129	0.1302418	$12.418 \times 10^{-4}$	1.0%
28.00	6.5	0.990	0.257	0.2611274	$41.274 \times 10^{-4}$	1.6%
1.50	6.5	0.990	0.036	0.0360317	$0.317 \times 10^{-4}$	0.1%
1.50	5.8	0.960	0.020	0.0199184	$0.816 \times 10^{-4}$	0.4%
3.50	6.0	0.990	0.051	0.0520164	$10.164 \times 10^{-4}$	2.0%
5.40	6.0	0.997	0.074	0.074683	$6.83 \times 10^{-4}$	0.9%
20.00	7.0	0.997	0.323	0.3226309	$3.691 \times 10^{-4}$	0.1%
3.00	5.9	0.960	0.027	0.0271576	$1.576 \times 10^{-4}$	0.6%
10.00	6.8	0.960	0.070	0.0702477	$2.477 \times 10^{-4}$	0.4%
23.00	6.0	0.962	0.114	0.1167338	$27.338 \times 10^{-4}$	2.4%

Tabela 8. Coeficientes para calcular o declive máximo de crescimento para cada bactéria.

Microrganismo	$a_i$									
	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_4$	$a_5$	$a_6$	$a_7$	$a_8$	$a_9$
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-28.0530	0.2469	7.2505	3.1783	0.0067	-0.0561	1.3009	-0.0054	-0.5609	-125.586
<i>Bacillus cereus</i>	-2.7330	0.1622	-0.8614	1.5969	0.0122	-0.1831	1.2199	-0.0025	0.072	-59.3343
<i>Bacillus licheniformis</i>	-29.1238	0.4592	6.4417	-12.1128	-0.0053	0.0649	2.7058	-0.0055	-0.4889	-54.4646
<i>Bacillus subtilis</i>	-20.5091	0.2066	4.7178	2.1808	0.0075	0.0456	-1.1555	-0.0025	-0.3835	19.8195
<i>Clostridium botulinum</i>	-32.7539	0.4803	7.6414	26.4667	0	-0.0939	-1.0452	-0.0096	-0.5609	-163.932
<i>Clostridium perfringens</i>	-7.4775	0.2831	0.0580	8.6498	0.0068	0.1154	2.3642	-0.0042	-0.0195	-153.4672
<i>Escherichia coli</i>	-20.3231	0.4115	4.1261	2.2349	0.0002	-0.2249	-0.0415	-0.006	-0.3162	-31.9882
<i>Listeria monocytogenes</i>	-18.2070	0.2029	3.9028	6.0167	0.0024	0.0408	-0.1241	-0.0028	-0.2886	-43.1797
<i>Salmonella</i>	-12.9739	0.3529	1.8967	6.4026	-0.0048	0.0224	-0.0118	-0.0043	-0.1336	-62.1296
<i>Shigella flexneri</i>	-17.2012	0.4993	1.7936	21.6882	-0.0044	0.3454	-0.5534	-0.0065	-0.1091	-182.8641
<i>Staphylococcus aureus</i>	-18.4275	0.3267	3.8293	-4.5893	0.0029	0.1031	0.9995	-0.005	-0.3105	-25.0405
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-15.3130	0.2159	3.2613	4.7524	-0.0118	0.1356	0.438	-0.0016	-0.2312	-93.5564
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	-28.3244	0.0976	7.8197	8.0746	0.0217	-0.1346	-0.5496	-0.0051	-0.6221	-31.9812
<i>Pseudomonas</i>	-14.0267	0.1571	3.2135	0.4892	0.0005	-0.0371	2.9697	-0.0021	-0.2671	-117.0019

Com estes valores, foram realizados entre 20 e 60 testes em ambientes aleatórios para cada bactéria. Os erros relativos obtidos encontram-se descritos na Tabela 9, divididos em:

- Erro relativo inferior a 5%,  $e_r < 5\%$ ;
- Erro relativo entre 5% e 10%,  $5\% < e_r < 10\%$ ;
- Erro relativo entre 10% e 15%,  $10\% < e_r < 15\%$ ;
- Erro relativo superior a 15%,  $e_r > 15\%$ .

Os valores apresentados na Tabela 9 correspondem ao número (em percentagem) de testes que se encontram dentro dos limites referidos.

Tabela 9. Erros relativos no cálculo de  $\mu_{\max}$  com valores estimados dos coeficientes  $a_i$ .

Microrganismo	Erro relativo, $e_r$				Número total de testes
	$e_r < 5\%$	$5\% < e_r < 10\%$	$10\% < e_r < 15\%$	$e_r > 15\%$	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	45%	23%	7%	25%	60
<i>Bacillus cereus</i>	64%	19%	14%	3%	36
<i>Bacillus licheniformis</i>	62%	24%	10%	5%	21
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	0%	0%	0%	21
<i>Clostridium botulinum</i>	86%	10%	5%	0%	21
<i>Clostridium perfringens</i>	95%	5%	0%	0%	20
<i>Escherichia coli</i>	80%	10%	10%	0%	20
<i>Listeria monocytogenes</i>	64%	27%	9%	0%	22
<i>Salmonella</i>	83%	4%	8%	4%	24
<i>Shigella flexneri</i>	86%	5%	10%	0%	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	62%	14%	24%	0%	21
<i>Yersinia enterocolitica</i>	76%	14%	5%	5%	21
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	100%	0%	0%	0%	21
<i>Pseudomonas</i>	95%	5%	0%	0%	20

### 3.3. Montagem do circuito do dispositivo

Para criar um dispositivo capaz de monitorizar a temperatura e humidade relativa, e também capaz de calcular o  $\log(\text{UFC/g})$  de diferentes bactérias a partir das medições efetuadas, foi concebido o circuito de teste apresentado na Figura 8.



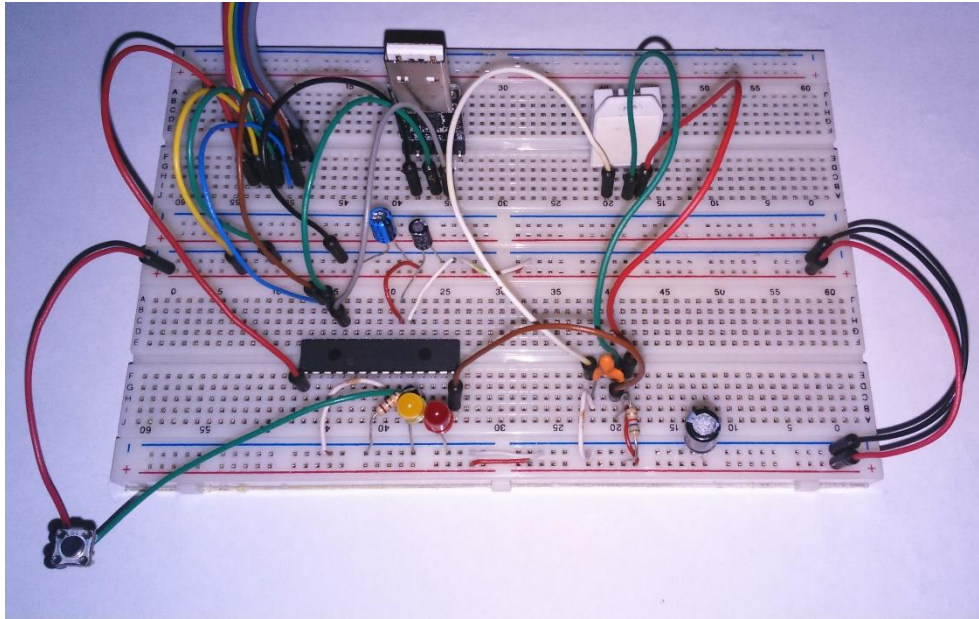


Figura 8 - Circuito de teste concebido para monitorização da temperatura e humidade relativa e verificação do crescimento bacteriano para diferentes bactérias.

### ***Componentes utilizados***

O microcontrolador utilizado é um PIC16F1716 de 28 pinos da MicroChip (2014). Este PIC opera em temperaturas entre -40 to 125°C, o que o torna apto para estar dentro de um equipamento de refrigeração, e com uma tensão entre 1.8V a 5.5V, o que permite que possa ser alimentado com uma pilha. A Tabela 10 descreve as especificações técnicas mais relevantes deste microcontrolador.

Tabela 10. Especificações técnicas do PIC16F1716.

Parâmetro	Valor
Tipo de memória de programa	Flash
Memória de programa (KB)	14
Portos Entrada/Saída (I/O ports)	25
Velocidade CPU (MIPS)	8
Memória RAM (KB)	1
Periféricos digitais de comunicação	1-UART, 1-SPI, 1-I2C
Periféricos de Captura/Comparação (CCP) e de PWM	2 CCP, 2 PWM
Temporizadores	4 x 8-bit, 1 x 16-bit
Conversor Analógico-Digital (ADC)	17 canais, 10-bit
Conversor Digital-Analógico (DAC)	1 x 8-bit, 1 x 5-bit
Comparadores	2
Gama de Temperatura (°C)	-40 to 125
Gama de tensão de operação (V)	1.8 a 5.5
Número de pinos	28
XLP	Sim
Cap Touch Channels	17

O sensor escolhido é o modelo AM2302 da Aosong. Trata-se de um sensor digital de temperatura e humidade. Consiste num elemento sensor capacitivo e um termistor do tipo NTC (*Negative Temperature Coefficient*) conectados a um microcontrolador de 8-bit. Tal como o PIC16F1716, opera a uma tensão entre 3.3 V e 5.5 V, e mede humidades relativas entre 0% e 99.9% e temperaturas entre -40°C e 80°C, com erros máximos de  $\pm 4\%$  e 0.4°C, respetivamente (ver Figura 9a e Figura 9b).

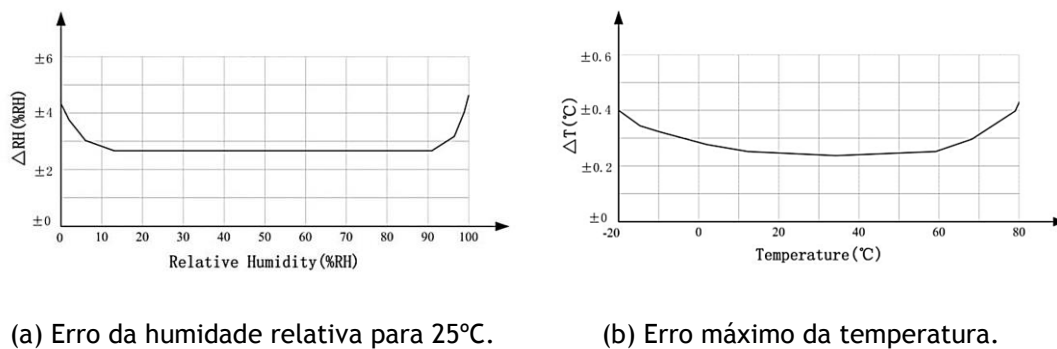


Figura 9 - Erros máximos nas medições de humidade relativa e de temperatura pelo sensor AM2302.

A comunicação entre o dispositivo e o interface é feita por USB através de um conversor de UART para USB de 3.3V.

A alimentação do dispositivo é feita através de uma pilha da Tadiran - modelo TL-5903 - com uma capacidade nominal de 2.4 Ah e uma tensão de 3.6 V, o que permite alimentar todos os componentes referidos. A escolha desta pilha específica deve-se ao facto de operar em temperaturas entre -55°C e 85°C.

Na Figura 10 estão representados os componentes descritos.



Figura 10 - Componentes utilizados no circuito de teste do dispositivo (da esquerda para a direita: pilha TL-5903, sensor AM2302, conversor de UART para USB).

### Descrição do circuito

Com a ferramenta online *Scheme-it* (Digikey, 2015), desenvolveu-se o circuito em forma de diagrama para ser mais facilmente analisado (ver Figura 11).

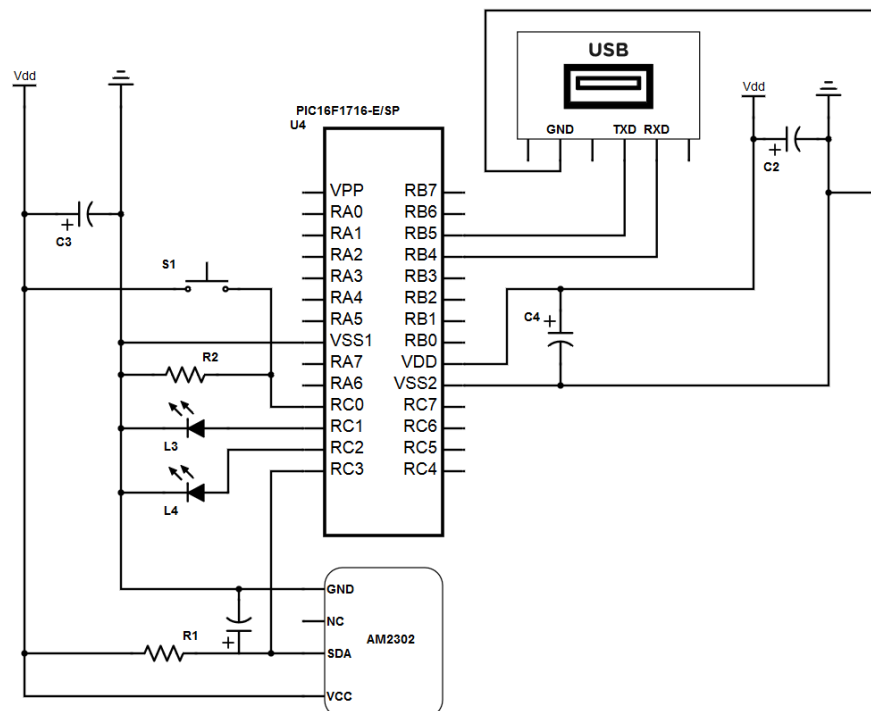


Figura 11 - Diagrama do circuito de teste.

Como já referido, a pilha utilizada fornece ao circuito 3.6 V, sendo este o valor associado a Vdd que alimenta os diferentes componentes. Os LED's representados na figura servem como indicadores da função a decorrer no programa, por exemplo, o LED vermelho, ligado à saída RC2 do microcontrolador, altera o seu estado (ON/OFF) cada vez que é feita uma leitura. Já o LED amarelo, ligado à saída RC1, é ativado para indicar que começou a comunicação com o interface. Para esta comunicação ter início, é necessário pressionar o botão representado por S1 até que o LED fique ativo, procedimento que será explicado, em detalhe, juntamente com a explicação do programa. É também relevante referir que, enquanto a comunicação entre o PIC e conversor UART para USB é feita através dos tradicionais pinos TX e RX, na comunicação entre o sensor de temperatura e humidade e o microcontrolador é utilizado apenas um pino. O método utilizado é denominado *1-wire* ou *single-bus communication*.

### Comunicação 1-wire

Este protocolo substitui a utilização de 2 pinos para comunicação e utiliza apenas um pino como entrada e saída de dados. Para iniciar a comunicação, o microcontrolador envia um sinal de *Start* composto por um bit '0' que permanece durante 1 ms, seguido de um bit '1' durante 30  $\mu$ s. Este sinal serve para informar o sensor que pode começar a enviar dados e, como tal, o pino do microcontrolador, designado para a ligação com o sensor, é definido como entrada. De modo a saber se o sinal de 'Start' foi enviado corretamente, o sensor envia um bit '0' acompanhado por um bit '1' com a duração de 80  $\mu$ s cada. A partir desse momento, os dados relativos à temperatura e à humidade são enviados na forma de 40 bits, divididos em grupos de 8 bits com a seguinte ordem: bits mais significativos da humidade relativa; bits menos significativos da humidade relativa; bits mais significativos da temperatura; bits menos significativos da temperatura; soma dos 4 grupos anteriores para verificar se os dados foram bem enviados. Para um bit '1', o sensor envia um sinal 'Low' durante 50  $\mu$ s, seguido de um sinal 'High' durante 70  $\mu$ s. Caso envie um bit '0', a duração do sinal 'Low' mantém-se e o sinal 'High' apenas dura 26  $\mu$ s. De modo a simplificar a transmissão de dados, os valores recebidos estão multiplicados por 10, para evitar a utilização de casas decimais. Como exemplo, é apresentado um conjunto de bits enviado pelo sensor na Figura 12:

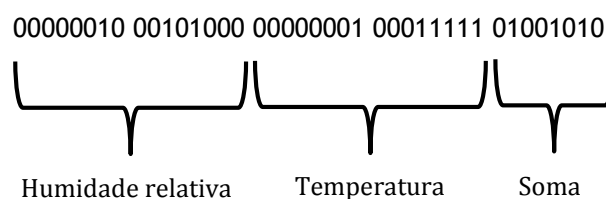


Figura 12 - Exemplo 1 de trama de comunicação enviada pelo sensor.

Em primeiro lugar, é possível verificar que os dados foram bem enviados, uma vez que a soma calculada corresponde aos últimos 8 bits recebidos:

$$00000001 + 00011111 + 00000010 + 00101000 = 01001010$$

Para obter o valor da temperatura em °C e da humidade relativa em percentagem, basta converter os 16bits correspondentes para decimal e dividir por 10:

$$00000010 \ 00101000(\text{bin}) \equiv 552 \ (\text{dec}) \Rightarrow 55.2\%$$

$$00000001 \ 00011111(\text{bin}) \equiv 287 \ (\text{dec}) \Rightarrow 28.7^{\circ}\text{C}$$

Se a temperatura for negativa, o processo é igual, com a diferença que o bit mais significativo do byte mais significativo da temperatura é igual a '1'. Na Figura 13 é apresentado um exemplo.

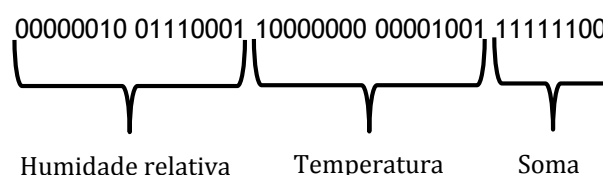


Figura 13 - Exemplo 2 de trama de comunicação enviada pelo sensor.

Após verificar que o valor da temperatura é negativo devido ao bit mais significativo ser igual a '1', esse bit é convertido para '0' e os cálculos são feitos do mesmo modo que no exemplo anterior:

$$00000010 + 01110001 + 10000000 + 00001001 = 11111100$$

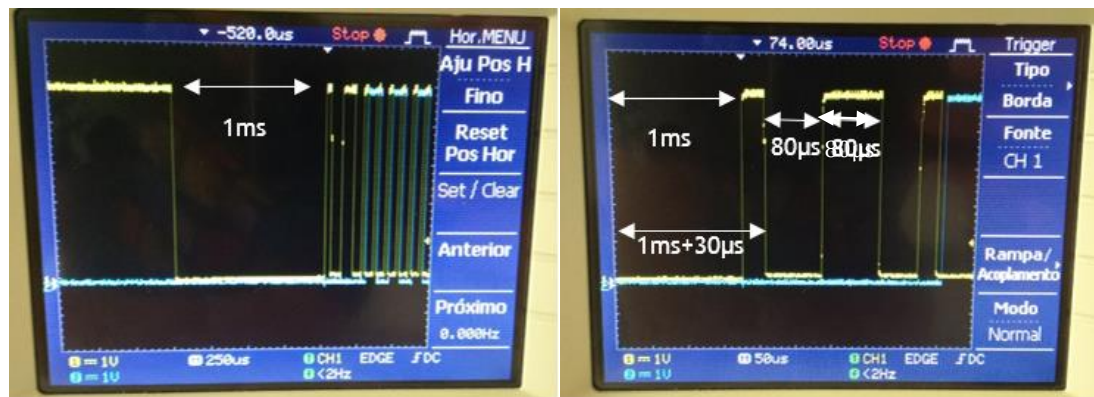
$$00000010 \ 01110001(\text{bin}) \equiv 625 \ (\text{dec}) \Rightarrow 62.5\%$$

$$00000000 \ 00001001(\text{bin}) \equiv 9 \ (\text{dec}) \Rightarrow -9^{\circ}\text{C}$$

Para perceber melhor o funcionamento deste protocolo, foi utilizado um osciloscópio de modo a visualizar a comunicação entre o PIC e o sensor, assim como a verificação que permite ao PIC saber se foi enviado um bit '0' ou '1'.

Na Figura 14 é possível ver o sinal de 'Start' enviado pelo PIC (1 ms a baixo e 30 μs a alto) e a resposta enviada pelo sensor como confirmação que foi recebido o sinal enviado (80 μs a baixo e 80 μs a alto). A Figura 15a representa o envio de dados por parte do sensor que, como já foi explicado, difere um bit '0' de um bit '1' pelo tempo que mantém o sinal a alto. Para que o microcontrolador saiba qual das duas hipóteses foi enviada, cada vez que o sensor envia um sinal alto, o PIC espera 30 μs e lê o sensor, caso continue alto é porque o sensor enviou um bit '1', se estiver a baixo é porque enviou um bit '0'. As leituras feitas pelo

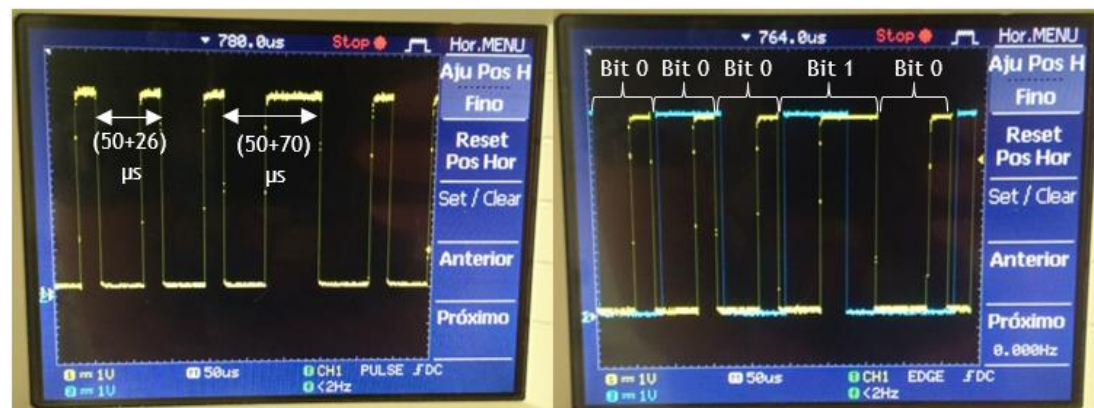
microcontrolador estão representadas na Figura 15b com a cor azul (cada alteração no sinal representa uma leitura). Esta análise encontra-se pormenorizada na Figura 16.



a) Envio do sinal de 'Start' pelo PIC.

b) Resposta enviada pelo sensor.

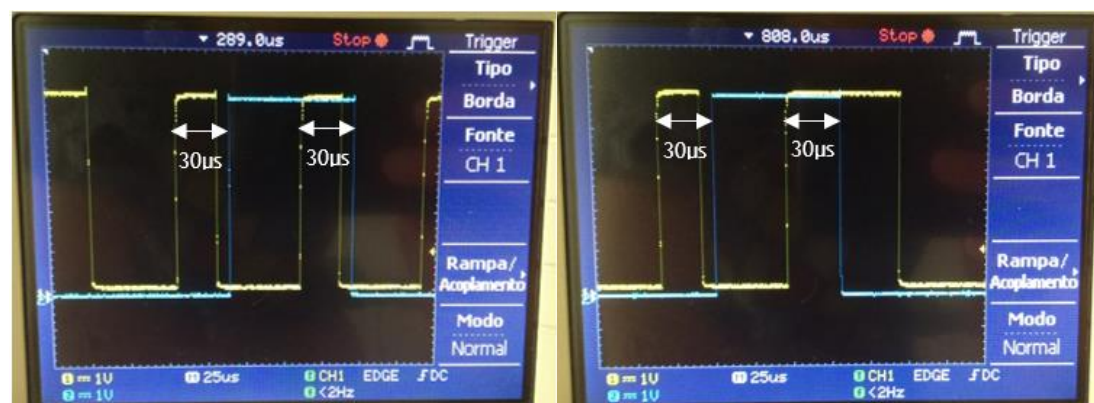
Figura 14 - Envio do sinal de 'Start' pelo PIC.



a) Sinal enviado pelo sensor composto por bits '1' e '0'.

b) Leitura por parte do PIC que permite saber qual foi o bit enviado.

Figura 15 - Sinal enviado pelo sensor.



a) Pormenor relativo ao envio de dois bits '0'.

b) Pormenor relativo ao envio de um bit '0' seguido de um bit '1'.

Figura 16 - Pormenores dos tipos de dados.

### 3.3.1. Programação do dispositivo

A programação do microcontrolador utilizado, feita a partir do software *MPLAB X*, envolve bastantes variáveis e funções. Como tal, a explicação do funcionamento do programa é realizada a partir do fluxograma da Figura 17, que representa as várias etapas do programa.

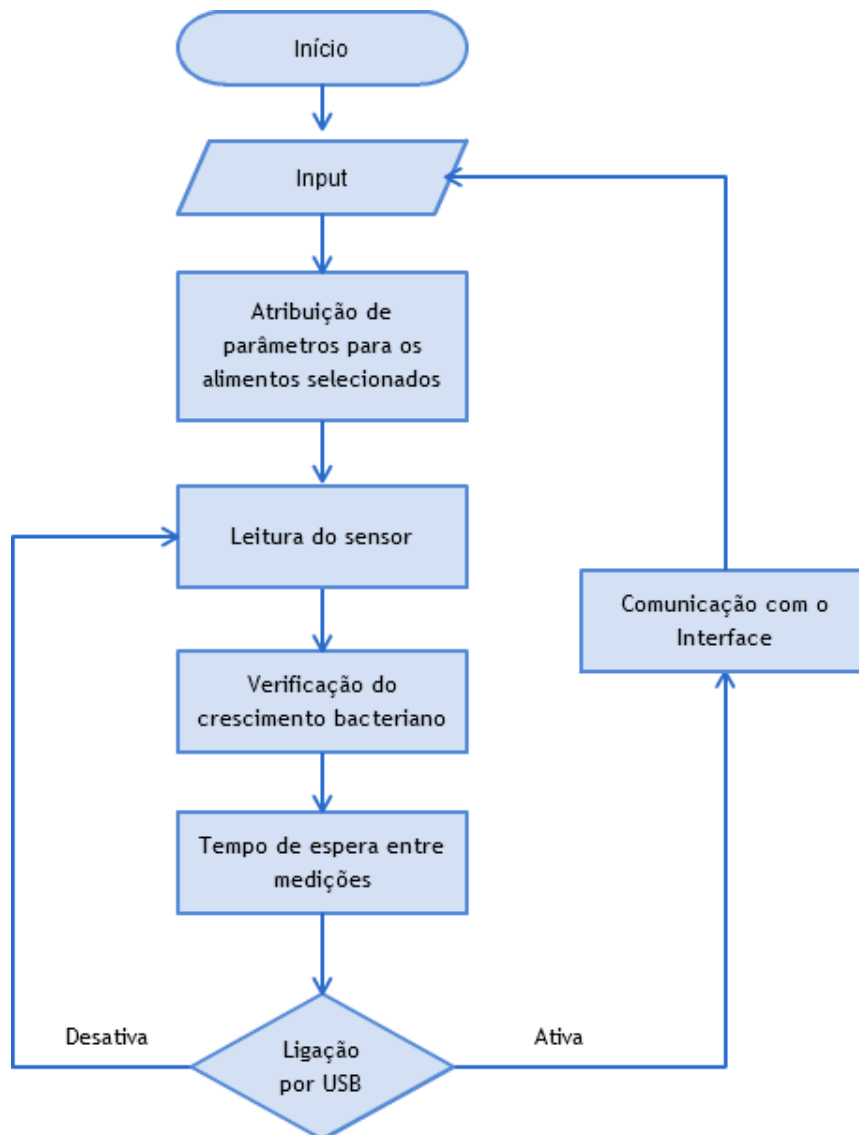


Figura 17 - Fluxograma da programação utilizada no microcontrolador PIC16F1716.

A explicação deste fluxograma é feita de seguida, estando dividida em tópicos com os nomes correspondentes aos apresentados no fluxograma.

## Início

Na Figura 11 foi utilizado um diagrama para representar o circuito de teste, no qual é possível visualizar as ligações entre o microcontrolador e os restantes componentes. A Figura 18 foi retirada do software de programação utilizado, onde são visíveis os pinos que foram ativados assim como o nome que lhes corresponde para definir essas ligações. Após serem atribuídos os pinos de entrada e saída, na fase inicial do programa são incluídas as bibliotecas necessárias para a execução do programa e declaradas as variáveis.

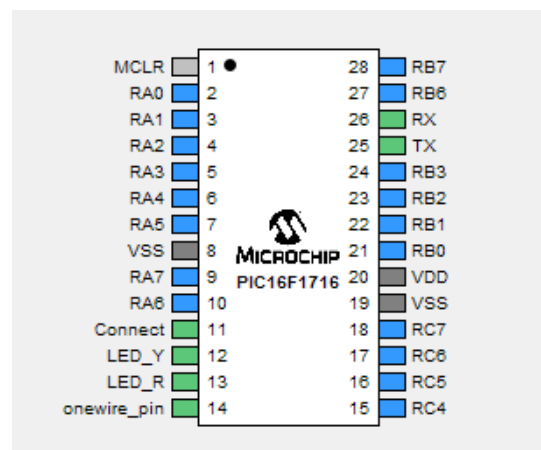


Figura 18 - Atribuição de nomes aos pinos definidos como entradas e saídas.

## Input

Ao comunicar com o interface, este envia para o programa informações acerca dos produtos alimentares a analisar, como será explicado na secção 3.3.3. Para simplificar a comunicação e o programa em si, foi criada uma variável - 'Food' - de 16bits onde cada bit corresponde a um produto alimentar. Se esse bit for igual a 1, o produto alimentar correspondente é analisado. Caso seja igual a 0, o produto alimentar é ignorado, dando indicação que não se encontra no interior do equipamento de refrigeração. Para definir qual o produto alimentar que corresponde a cada bit, foi utilizada a ordem da Tabela 2, sendo o primeiro alimento associado ao bit mais significativo (ver

Tabela 11).

Tabela 11. Associação de cada alimento a um bit da variável 'Food'.

Bit	15	14	13	12	(...)	2	1	0
Produto	Aves	Porco	Vaca	Leite	(...)	Alface	Batatas	Tomate



Se, por exemplo, a variável tiver o valor A42C(hex)  $\equiv$  10100100 00101100 (bin), significa que os produtos alimentares a analisar são: carne de aves, carne de vaca, ovos, caranguejo, peixe fresco e alface.

#### ***Atribuição de parâmetros para os produtos alimentares selecionados***

Após serem definidos os produtos alimentares, uma base de dados no programa atribui valores a 4 variáveis que dependem do produto alimentar a analisar (uma vez que é analisado um produto alimentar de cada vez). Essas variáveis são o pH, a  $a_w$  e correspondentemente  $b_w$ , e uma variável 'Bact' que segue o mesmo modelo da variável 'Food', isto é, composta por 16 bits em que cada bit é associado a uma bactéria. Um bit com o valor '1' representa que a bactéria associada a esse bit afeta o produto alimentar em causa (ver Tabela 3).

#### ***Leitura do Sensor***

Como já indicado, a leitura dos dados do sensor é feita através do protocolo de comunicação *1-wire* em que o PIC envia um sinal a baixo durante 1 ms, a alto durante 30  $\mu$ s, aguarda 160  $\mu$ s e começa a ler os dados enviados pelo sensor. Após serem recebidos os dados, é feita a soma dos 4 primeiros bytes e comparada com o quinto byte recebido. Caso o valor seja o mesmo, os 4 bytes são atribuídos a duas variáveis - 'Temp' e 'HR' - tendo em atenção se o valor da temperatura é positivo ou negativo.

#### ***Verificação do crescimento bacteriano***

Nesta secção do programa, são utilizadas as equações de  $\mu_{max}$  e de  $y(t)$  calculadas anteriormente, para verificar se algum dos produtos alimentares em análise atingiu a dose infetante de alguma das bactérias nele presente. A explicação deste excerto do programa encontra-se no fluxograma representado na Figura 19.

O processo, representado no fluxograma indicado, baseia-se em ciclos encadeados e operações condicionais. O ciclo inicial é repetido 16 vezes em que cada repetição corresponde à análise de um alimento diferente. Depois de ser selecionado um dos alimentos, é começado um novo ciclo, que se repete 12 vezes. Esta rotina tem a função de verificar cada uma das bactérias que afetam o alimento em causa. Depois de selecionada uma das bactérias, são atribuídos os parâmetros que a definem, e comparada a temperatura medida pelo sensor com a temperatura mínima e máxima a que o organismo se desenvolve.

Se a temperatura estiver dentro dos limites, é calculado  $y(t)$  e verificado se houve variação da temperatura medida pelo sensor comparativamente à medição anterior. No caso afirmativo, o valor de  $y_0$  é atualizado com o valor de  $y(t)$ . Para finalizar, é feita a verificação entre o valor de  $y$  limite para a bactéria e o valor de  $y(t)$  calculado, e caso o limite seja ultrapassado é ativado o LED de indicação que o alimento não se encontra em condições de ser consumida.

### Comunicação com o interface via USB

A utilização do conversor UART para USB, permite uma fácil comunicação entre o microcontrolador e um interface criado em Matlab, que será explicado na próxima secção. A comunicação baseia-se apenas em enviar os valores guardados de temperatura e humidade relativa, e receber a informação de quais os produtos alimentares a verificar.

O envio de dados por parte do PIC é feito através da escrita pela UART - função EUSART\_Write - seguida da receção de um bit de confirmação - função EUSART\_Read. A receção de dados é feita do modo oposto: o microcontrolador aguarda que sejam enviados os dados por parte do interface e de seguida envia um bit de confirmação.

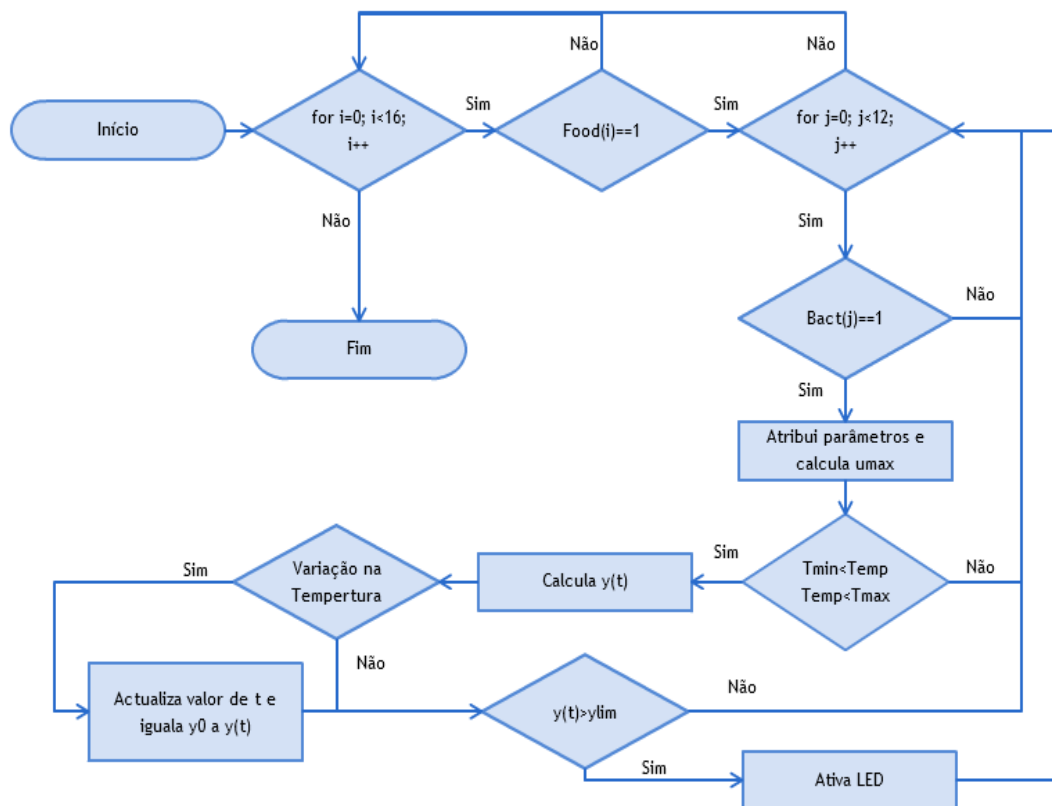


Figura 19 - Fluxograma da verificação do crescimento bacteriano.

## 3.4. Interface gráfico do utilizador

### 3.4.1. GUIDE

Na realização desta dissertação foi indispensável a utilização do programa Matlab. Este software tem uma enorme gama de aplicações, derivado às inúmeras ‘Toolbox’s’ que abrangem temas desde computação numérica até modelos aeroespaciais, passando por processamento de imagem, som e vídeo, e até simulações de redes neuronais.

A ‘Toolbox’ GUIDE (ver Figura 20) tornou possível a criação dos interfaces utilizados nesta dissertação. Esta ferramenta, tal como o nome indica, permite criar um interface (GUI - *Graphical User Interface*) através do qual o utilizador define as entradas e observa as saídas de um programa correspondente. Para isso dispõe de botões, caixas de texto, tabelas, menus, entre outros, que o programador pode utilizar para criar o ambiente do interface (ver Figura 21a).

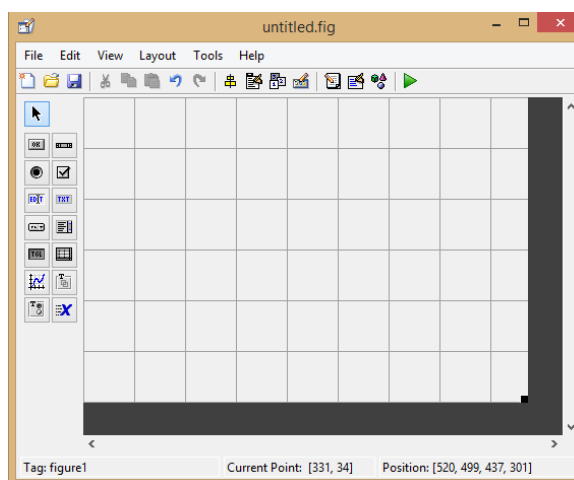
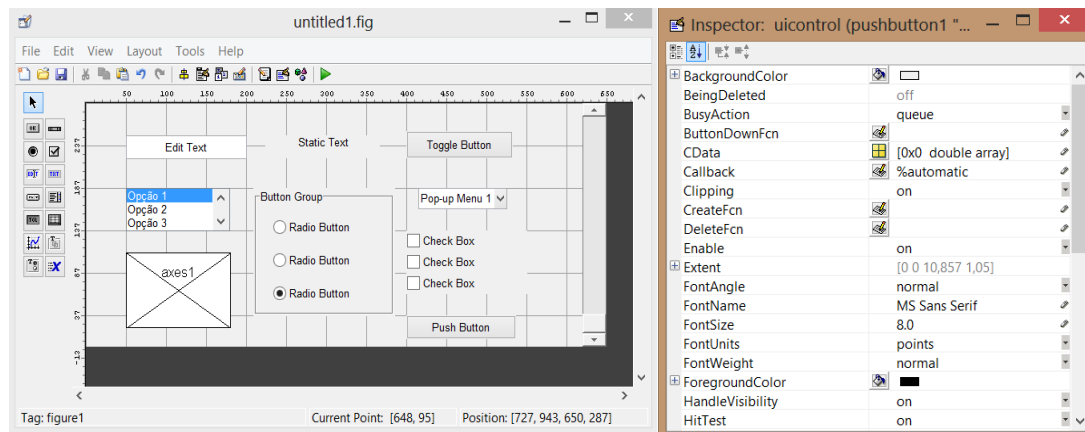


Figura 20 - Toolbox GUIDE.

O método de programação é extremamente simples. Para criar o ambiente gráfico, o programador apenas tem que escolher os itens que pretende utilizar e arrastá-los para os locais desejados. Independentemente do item selecionado, este pode ser configurado a partir do *Property Inspector* (ver Figura 21b). Nesta configuração é definida uma *tag* que fica associada ao item e através da qual este é identificado no programa que rege o interface.

O ambiente gráfico criado é guardado com a extensão .fig e tem associado um ficheiro .m no qual é programada a função de cada componente do interface, que pode ser preencher uma tabela, abrir um outro ficheiro, desenhar um gráfico, e muito mais. Para isso, existe uma função ‘Callback’ associada a cada elemento gráfico que é chamada quando o utilizador interage com esse elemento. No programa, as funções mais utilizadas são a função *get* para ler algo que o utilizador possa ter introduzido, por exemplo num menu pop-up, e a função *set* para escrever algo num elemento gráfico como, por exemplo, uma caixa de texto.



(a) Exemplo de itens criados

(b) *Property Inspector*.

Figura 21 - Exemplo de utilização da ferramenta GUIDE.

### 3.4.2. Interface gráfico para crescimento bacteriano com parâmetros constantes

Depois da determinação dos coeficientes que caracterizam o declive máximo de crescimento para cada bactéria (ver Tabela 8), foi criado um código em MatLab que permite ao utilizador escolher uma bactéria que queira analisar e os fatores relativos ao ambiente em que a bactéria se encontra (temperatura, pH e atividade de água). Após serem introduzidos os dados, é apresentada a curva de crescimento correspondente, com a possibilidade de a conferir com a curva apresentada na ferramenta *ComBase Predictor*. Os vários casos testados são apresentados numa tabela onde é possível selecionar um, ou mais, desses casos, e observar novamente o(s) gráfico(s) correspondente(s). Juntamente com o gráfico, uma vez que é o objetivo desta dissertação, é também exibido o tempo que a bactéria demora a atingir a dose infetante de UFC/g.

A Figura 22 apresenta o interface criado quando é inicializado, e na Figura 23 apresenta-se um exemplo dos resultados fornecidos pelo interface durante a análise de diferentes bactérias e ambientes. Seguidamente, serão explicadas as funções de cada objeto presente no interface.

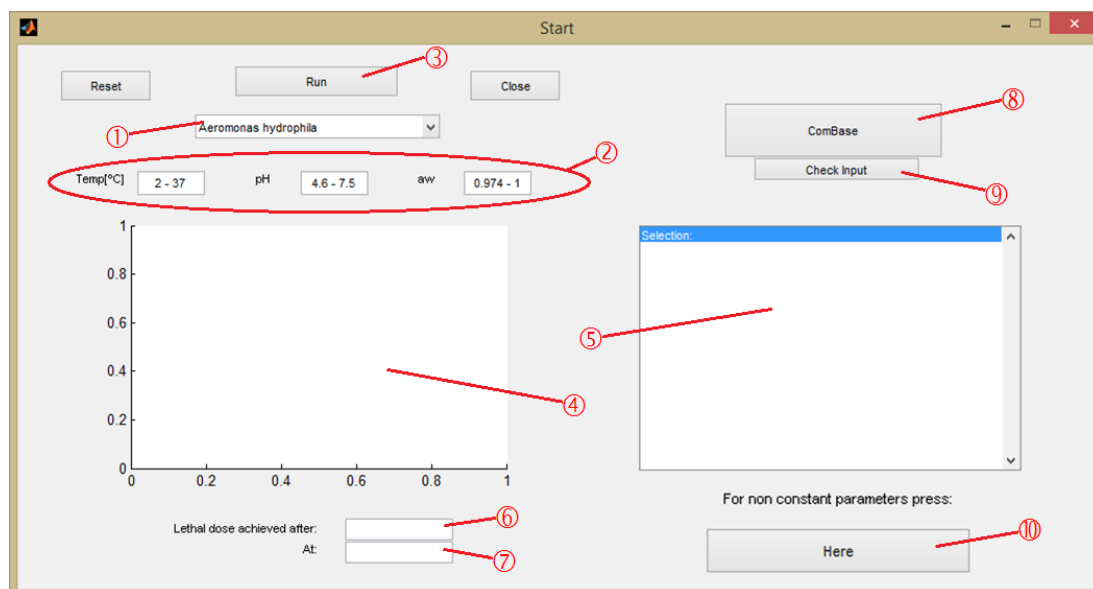


Figura 22 - Interface que permite analisar o crescimento de diferentes bactérias em diferentes ambientes.

Ao iniciar o programa, é possível escolher no menu pop-up (① - Figura 22) uma das 14 bactérias apresentadas na secção 2.2.2, o que escreve de imediato os limites mínimos e máximos para a temperatura, pH e atividade de água nas caixas de texto correspondentes (② - Figura 22). Após serem introduzidos os parâmetros necessários e pressionado o botão 'Run' (③ - Figura 22), o modelo de crescimento é apresentado (④ - Figura 22) e as características guardadas na caixa de seleção à direita (⑤ - Figura 22). A caixa de texto que se encontra imediatamente por baixo do gráfico (⑥ - Figura 22) mostra o tempo necessário para a dose infetante ser atingida, assim como o valor dessa dose é mostrado na caixa em baixo (⑦ - Figura 22). Ao carregar no botão 'ComBase' (⑧ - Figura 22), é automaticamente aberta a ferramenta *ComBase Predictor* na página [www.Combase.cc](http://www.Combase.cc) (após serem introduzidas as credenciais necessárias para aceder à página) e também um ficheiro Excel (ver Figura 24). O utilizador deve copiar os dados apresentados pelo *Combase* para o gráfico escolhido e introduzi-los nas colunas A e B do ficheiro Excel aberto (para evitar erros no código devem ser copiados 1000 valores, sendo que a maneira mais simples é selecionar na ferramenta online que o gráfico seja apresentado até 900 horas e copiar todos os valores expostos em 'Data points'). Após gravar o ficheiro Excel e pressionar o botão 'Check Input' (⑨ - Figura 22), o gráfico retirado do *ComBase* é exposto juntamente com o último gráfico selecionado.

Para visualizar mais do que um gráfico, o utilizador deve carregar na tecla 'Ctrl' enquanto seleciona da lista à direita os gráficos pretendidos. No caso de estar mais do que um gráfico

visível, a caixa de texto da dose infetante e a do limite de UFC/g apresentam vários valores, sendo o valor mais à esquerda correspondente à situação mais em cima na lista da direita.

Para finalizar existe o botão 'Reset' (① - Figura 23), que reinicia o interface, e o botão 'Close' (② - Figura 23), que o encerra. No canto inferior direito encontra-se um botão que será explicado na próxima secção.

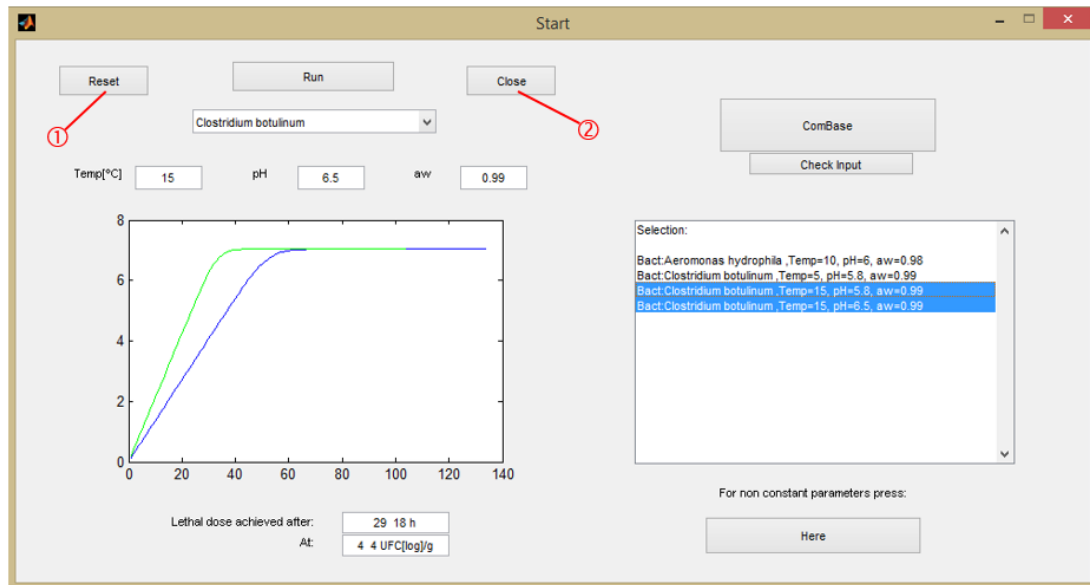


Figura 23 - Exemplo de utilização do interface criado.

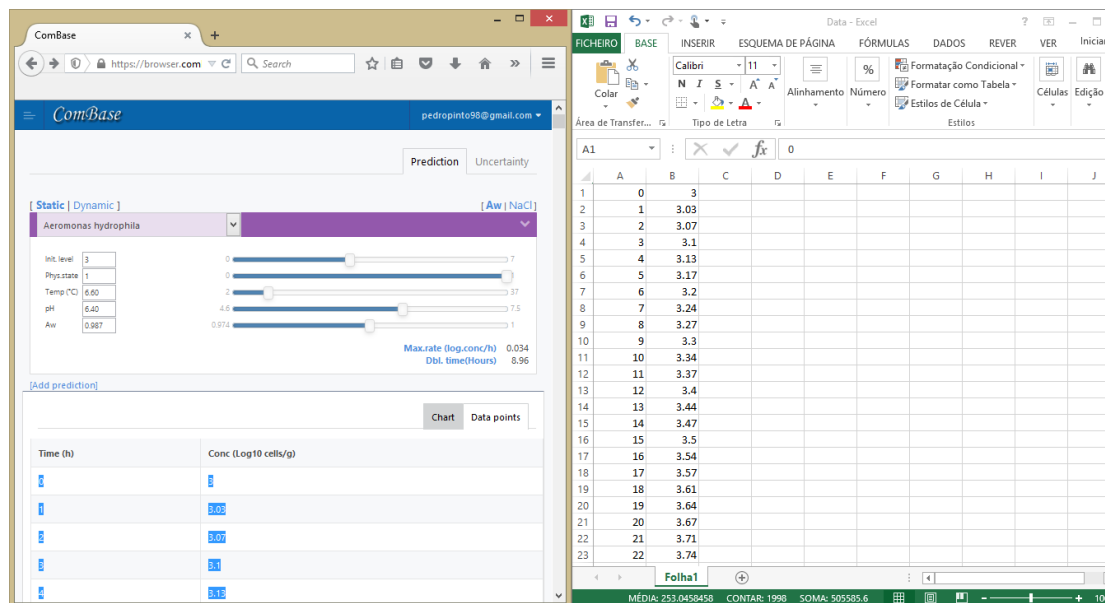


Figura 24 - Página apresentada e ficheiro de Excel aberto após ser ativado o botão 'ComBase'.

### 3.4.3. Interface gráfico para crescimento bacteriano com parâmetros variáveis

Na secção 3.3.2 foi criado um interface para determinar e prever o crescimento bacteriano de um conjunto de bactérias em ambientes definidos pelo utilizador. No entanto, ainda não foi referido o caso dos fatores extrínsecos serem alterados durante o crescimento do microrganismo em questão. Para contemplar esta situação, existe um botão ‘Here’ no interface (⑩ - Figura 22) que tem a função de abrir uma nova janela (ver Figura 25) onde é possível verificar como as alterações ao ambiente influenciam o crescimento bacteriano. Este interface é semelhante ao anterior, com a diferença do botão ‘Factors’ (① - Figura 25) que abre um ficheiro de Excel onde são introduzidos os parâmetros que definem o ambiente (correspondente variação dos parâmetros extrínsecos) onde a bactéria se encontra, assim como o tempo durante o qual esses parâmetros se mantêm constantes (① - Figura 26).

A Figura 27 mostra o resultado para o exemplo da Figura 25, que é gerado após ser premido o botão ‘Run’ (② - Figura 25). Uma vez que a bactéria atingiu a fase de estabilização durante o terceiro ambiente considerado, o último caso que teria início às 510h é suprimido.

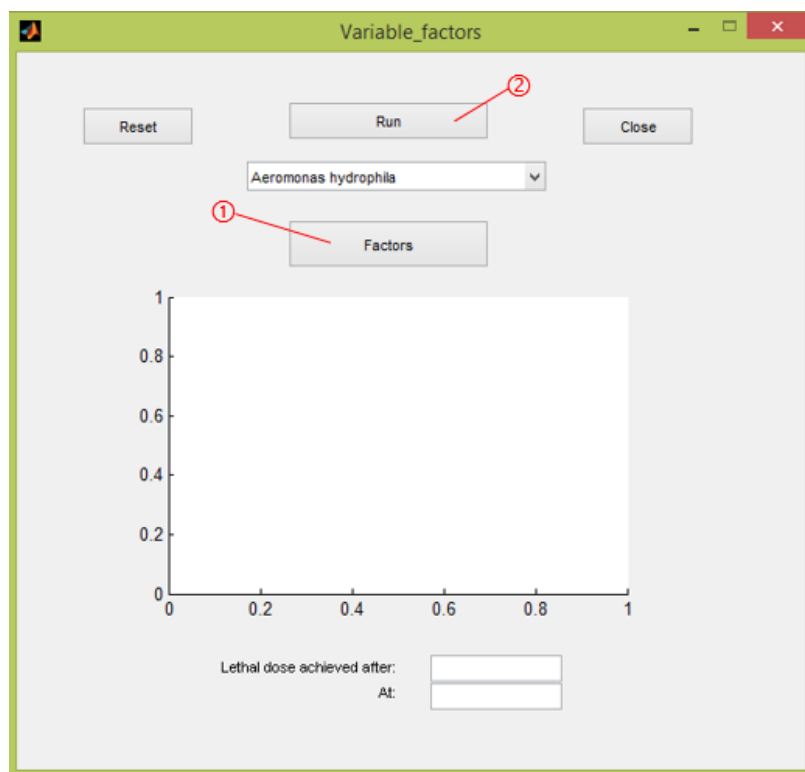


Figura 25 - Interface alternativo que prevê o crescimento microbiano com mudanças nos fatores extrínsecos ao longo do tempo.

Time of change (h)					Factors	
					Temp(°C)	pH
					aw	
0	10	5	0.98			
50	15	5	0.98			
120	20	5	0.98			
510	17	5	0.98			

Microorganism	T <sub>min</sub> [°C]	T <sub>max</sub> [°C]	pH <sub>min</sub>	pH <sub>max</sub>	a <sub>w, min</sub>	a <sub>w, max</sub>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	37	4.6	7.5	0.974	1
<i>Bacillus cereus</i>	5	34	4.9	7.4	0.94	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	13	34	4	7.6	0.907	1
<i>Bacillus subtilis</i>	10	34	4.3	7.8	0.933	1
<i>Clostridium botulinum</i>	4	30	5.1	7.5	0.974	1
<i>Clostridium perfringens</i>	15	52	5	8	0.971	1
<i>Escherichia coli</i>	10	42	4.5	7.5	0.961	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	40	4.4	7.5	0.934	1
<i>Salmonella</i>	7	40	3.9	7.4	0.973	1
<i>Shigella flexneri</i>	15	37	5.5	7.5	0.971	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5	30	4.4	7.5	0.907	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1	37	4.4	7.2	0.957	1
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0	30	5.5	7	0.95	1
<i>Pseudomonas</i>	0	20	5	7.4	0.961	1

Figura 26 - Excel no qual são introduzidos os valores de temperatura, pH e  $a_w$  ao longo do tempo.

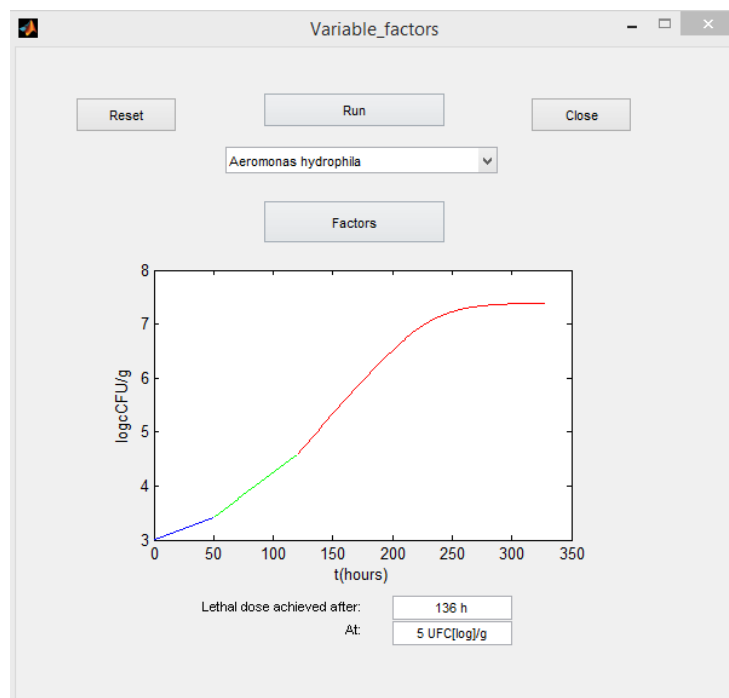


Figura 27 - Gráfico correspondente ao exemplo da Figura 25.



### 3.4.4. Interface do dispositivo

Como anteriormente referido, para que o utilizador possa interagir com o dispositivo foi criado um interface na ferramenta GUI do Matlab. Este interface será explicado em detalhe nesta secção, iniciado com o ecrã de abertura do interface na Figura 28.

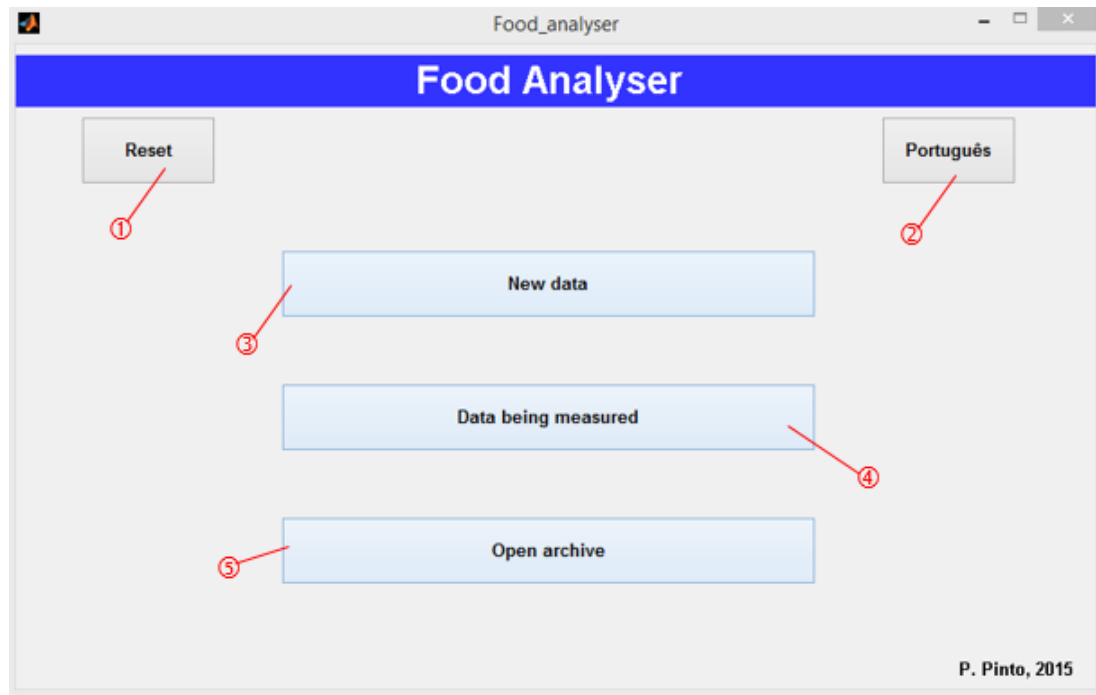


Figura 28 - Ecrã inicial do interface do dispositivo.

No canto superior esquerdo da Figura 28 encontra-se um botão de 'Reset' (1 - Figura 28) que reinicia todos os valores e gráficos do interface, que podem ser vistos mais à frente. Uma vez que dados importantes podem ser perdidos por carregar acidentalmente neste botão, é aberta uma janela de confirmação (ver Figura 29).

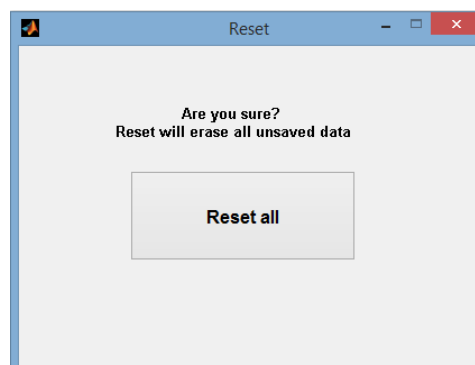


Figura 29 - Confirmação após carregar no botão 'Reset'.

O botão no canto superior direito '*Português*' (② - Figura 28) está presente nos diferentes ecrãs do interface e tem a função de traduzir todo o ecrã para a Língua portuguesa. Após ser selecionado, a palavra do botão é alterada para '*English*' e a função é traduzir todo o texto presente nos ecrãs para Língua inglesa.

O menu representado por três botões no centro do ecrã na Figura 28 permite ao utilizador escolher entre começar uma nova análise para novos produtos alimentares '*New Data*' (③ - Figura 28), sem que seja necessário perder os dados medidos anteriormente, ver os dados guardados no dispositivo assim como os gráficos correspondentes, '*Data being measured*' (④- Figura 28), ou ver dados mais antigos que, apesar de já não se encontrarem no dispositivo, foram guardados pelo interface, '*Open archive*' (⑤ - Figura 28). Caso seja escolhida a primeira opção, o ecrã apresentado é o que se encontra na Figura 30.

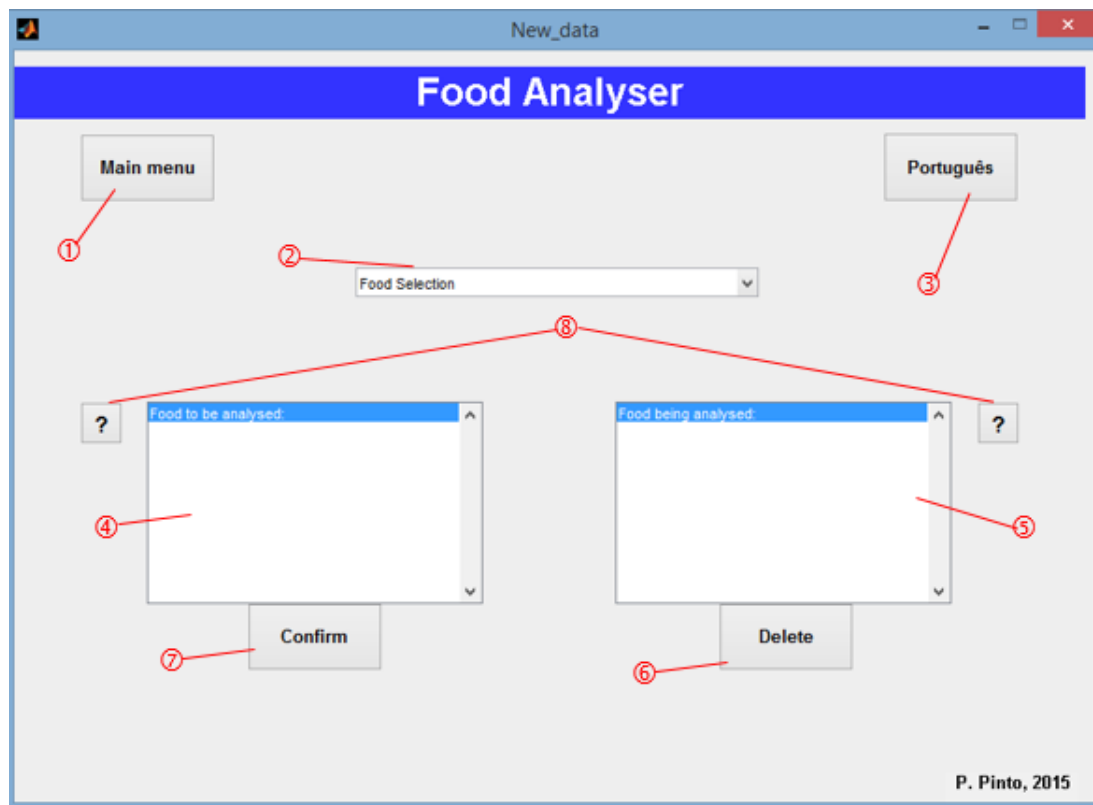


Figura 30 - Ecrã apresentado para seleção de novos alimentos.

Neste ecrã, o botão de '*Reset*' foi substituído por um botão que permite o retorno ao ecrã principal (① - Figura 30). O menu *pop-up* (② - Figura 30) permite selecionar quais os produtos alimentares que o utilizador pretende analisar, isto é, aqueles que se encontram conservados no interior do equipamento de refrigeração. Na Figura 31 é apresentado, após

premir o botão no canto superior direito (③ - Figura 30), um exemplo dessa seleção. Ao serem selecionados, os produtos alimentares são expostos na caixa à esquerda (④ - Figura 30), sendo possível retirá-los dessa lista usando o cursor para os selecionar. Na caixa à direita (⑤ - Figura 30), são apresentados os produtos alimentares que o dispositivo está a analisar. Se, por exemplo, algum desses produtos alimentares já não se encontrar no interior do equipamento de refrigeração e quiser ser eliminado, uma vez que não é necessário continuar a analisar o crescimento bacteriano nesse produto alimentar, basta selecioná-lo e pressionar o botão ‘Delete’ (⑥ - Figura 30). Ao carregar em ‘Confirm’ (⑦ - Figura 30), os produtos alimentares expostos na caixa da esquerda são transferidos para a caixa da direita representando que irão ser analisados e esta informação é comunicada ao dispositivo. Os botões caracterizados por pontos de interrogação (⑧ - Figura 30) servem para dar uma pequena explicação do que foi aqui descrito.

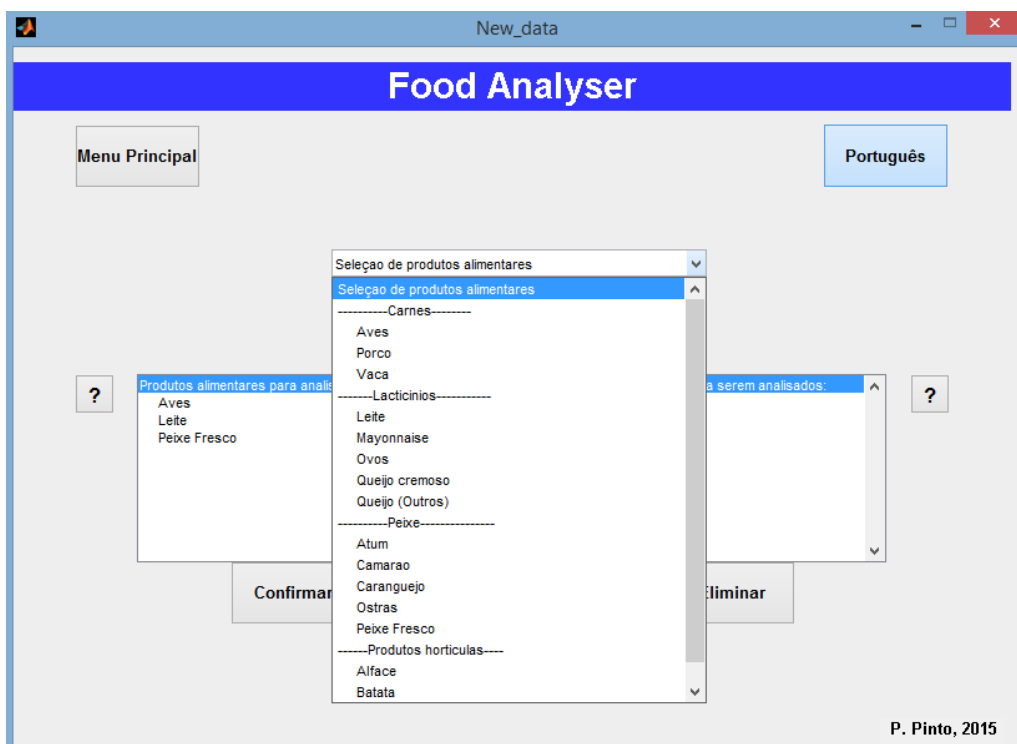


Figura 31 - Ecrã apresentado para seleção de novos alimentos.

Ao regressar ao menu principal e selecionando o botão correspondente à análise dos dados que foram medidos, é aberto o ecrã apresentado na Figura 32. Após premir o botão ‘Connect’ (① - Figura 32), a comunicação com o dispositivo é realizada e a tabela à esquerda (② - Figura 32) é atualizada com os dados retirados do dispositivo. O mesmo acontece com as caixas relativas aos produtos alimentares e às bactérias (③ - Figura 32), que são preenchidas

com informações das medições que foram efetuadas. Os botões à direita da área onde irão ser representados os gráficos (④ - Figura 32), permitem escolher entre visualização do gráfico da temperatura (⑤ - Figura 32), da humidade relativa (⑥ - Figura 32) ou do crescimento bacteriano (⑦ - Figura 32), em função do tempo. Uma vez que o dispositivo apenas indica, através de um LED, que algum produto alimentar se deteriorou, a análise completa é feita nesta secção do interface, onde é indicada, após seleccionar algum produto alimentar, a data em que começou a ser analisado (em que foi introduzido no equipamento de refrigeração) (⑧ - Figura 32) e a data em que as bactérias nele presente atingiram uma UFC/g superior à dose considerada limite (⑨ - Figura 32). O botão no canto inferior esquerdo - 'Save data' - (⑩ - Figura 32) permite ao utilizador gravar num ficheiro de Excel as medições apresentadas na tabela imediatamente acima do botão. Os dados guardados deste modo podem ser revistos em qualquer altura, com ou sem o dispositivo ligado por USB, através do último botão do menu principal. A utilização deste segmento do interface será exemplificada no capítulo 'Análise e Discussão de Resultados'.

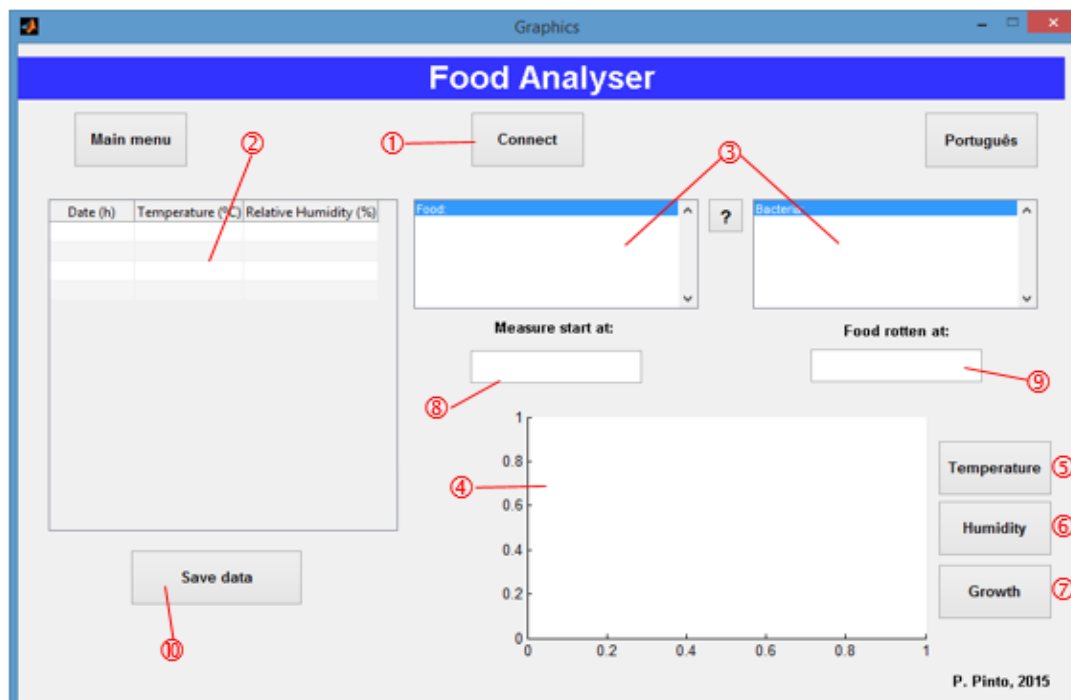


Figura 32 - Apresentação dos dados guardados e os gráficos correspondentes.

### 3.5. Procedimentos de teste

Para testar o dispositivo criado, validar os valores dos parâmetros extrínsecos medidos, assim como o interface que permite ao utilizador interagir com o mesmo, foi utilizado o

datalogger da Lascar Electronics EL-USB-2-LCD+ (ver Figura 33). As funções deste dispositivo são a medição da temperatura, da humidade relativa e da temperatura do ponto de orvalho. Tem a capacidade de medir temperaturas entre  $-35^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$  e humidades entre 0% e 100%.

O datalogger consiste num equipamento de medição composto por uma bateria, por um sensor e por uma saída USB (*Universal Serial Bus*) para descarregar para o computador os dados gravados na memória. O datalogger é acompanhado por um software que permite configurar o seu funcionamento, desde o tempo desejado para as medições, definição de temperatura, definição dos valores dos alarmes de temperatura (máximo e mínimo); ativação dos alarmes de temperatura; definição da apresentação de dados no LCD (*Liquid Crystal Display*) durante as medições; o procedimento aquando de memória cheia, ativação e definição dos alarmes de HR (máxima e mínima) até à seleção do momento de início da aquisição de dados. Na Tabela 12 são apresentadas as especificações técnicas deste dispositivo.



Figura 33 - Datalogger da Lascar Electronics EL-USB-2-LCD+.

Tabela 12. Especificações do datalogger.

Modelo		EL-USB-2-LCD+
Função		Medição de temperatura Medição de humidade relativa Medição de temperatura de ponto de orvalho
Intervalo de Medições		Temperatura: $-35^{\circ}\text{C}$ a $80^{\circ}\text{C}$ Humidade Relativa (HR): 0 a 100%
Precisão	Típica	$\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ ; $\pm 2,0\%$ HR
	Máxima	$\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ; $\pm 4,0\%$ HR
Memória de Leituras		16382
Bateria		3,6V 1/2AA
Vida da Bateria		1 ano

A comparação feita entre os valores medidos pelo datalogger referido e pelo dispositivo criado resultou numa diferença de temperaturas máxima de  $1^{\circ}\text{C}$  e de humidades relativas a rondar 5%.

Para analisar o desempenho do interface, foram realizadas medições num frigorífico doméstico durante alguns dias, que foram mais tarde coletadas e analisadas pelo interface em questão. De modo a verificar o total desempenho do interface, foi considerado que todos produtos alimentares se encontravam em análise.

### **3.6. Nota conclusiva**

Neste capítulo foi demonstrado como obter os coeficientes que relacionam os fatores intrínsecos e extrínsecos com o declive máximo obtido nas curvas de crescimento. Estes coeficientes permitem ter uma total liberdade na exploração de como a variação da temperatura, pH e  $a_w$  do ambiente que envolve a bactéria influenciam o seu crescimento.

A montagem do circuito revelou que é possível criar um dispositivo semelhante a um datalogger de temperatura e humidade relativa, com a função acrescida de avisar também o utilizador quando algum dos produtos alimentares disposto no equipamento de refrigeração se encontra deteriorado.

## 4. Análise e Discussão de Resultados

### 4.1. Introdução

Este capítulo, tal como os anteriores, encontra-se dividido em duas partes: uma secção dedicada ao crescimento bacteriano e outra referente ao dispositivo criado.

O cálculo dos coeficientes da equação de  $\mu_{\max}$  permite escrevê-la apenas em função dos fatores intrínsecos e extrínsecos que definem o crescimento de cada bactéria, isto é, em função da temperatura, pH e atividade de água. Na secção 4.2 é utilizada essa equação para analisar como estes parâmetros influenciam o crescimento bacteriano, sendo apresentados os gráficos resultantes de uma aplicação desenvolvida em Matlab destinada a relacionar estas 4 grandezas.

Numa fase posterior do capítulo, é apresentado um exemplo prático do interface gráfico desenvolvido, onde são utilizados os valores medidos pelo datalogger num frigorífico doméstico durante 118 horas, com o intuito de prever como se desenvolveria cada uma das bactérias estudadas.

### 4.2. Influência da temperatura, pH e atividade de água no declive máximo de crescimento

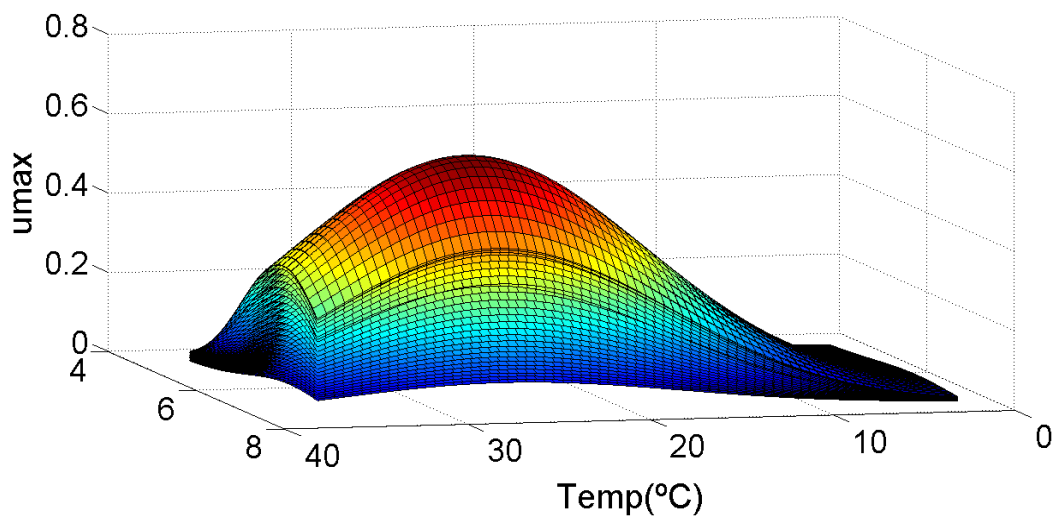
Sabendo que parâmetros como a temperatura, a atividade de água e o pH influenciam a curva de crescimento bacteriano, é importante verificar como é que o declive máximo atingido no crescimento de uma bactéria é afetado por estas variáveis. Como não se encontram gráficos que representem esta relação, foi criado um código em MatLab que apresenta um gráfico tridimensional destinado à visualização da previsão da variação dos três parâmetros referidos, assim como o resultado do declive máximo obtido para essa bactéria quando exposta aos fatores intrínsecos e extrínsecos considerados. Uma vez que apenas é possível construir gráficos até 3 variáveis, e para este caso é necessário verificar alterações em 4 parâmetros, a temperatura e o pH foram representados nos eixos x e y e o valor de  $\mu_{\max}$  no eixo z. Para representar como a variação de  $a_w$  afeta o declive máximo, foi atribuído o menor valor de  $a_w$  e construído o gráfico. De seguida, esse valor foi incrementado e apresentado o gráfico para o novo valor de  $a_w$  na mesma figura, sendo este processo repetido até atingir o valor máximo de  $a_w$ . Deste modo é possível visualizar a alteração de 4 variáveis no mesmo gráfico. Como complemento, foi também criado um gráfico que representa o valor máximo de  $\mu_{\max}$  obtido para cada valor de  $a_w$  testado, e onde é apresentado o valor máximo do declive da curva de crescimento para essa bactéria e as condições em que acontece.

Apesar de todas as bactérias seguirem o mesmo modelo de desenvolvimento, o seu crescimento pode ser bastante distinto, derivado da alteração do ambiente onde se encontram. De seguida, são analisadas essas diferenças para as 14 bactérias consideradas neste estudo, acompanhadas pelos respetivos gráficos.

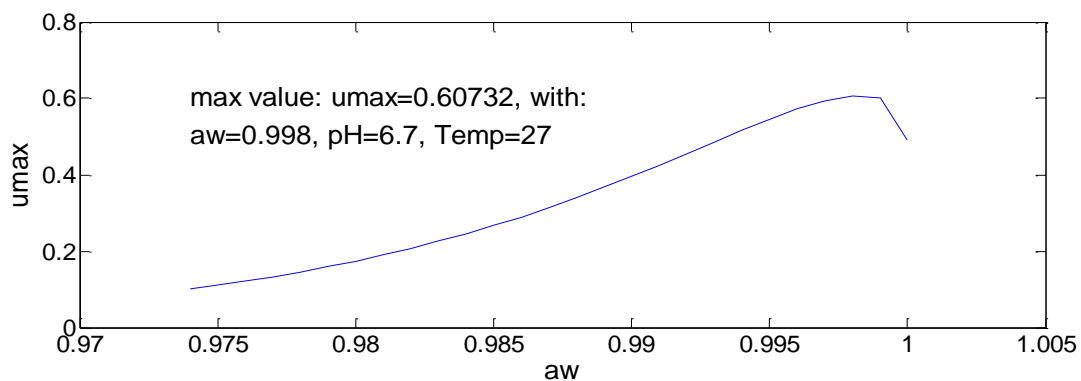


***Aeromonas hydrophila***

Na Figura 25, referente a esta bactéria verifica-se que ocorre o tipo de crescimento mais usual entre as bactérias analisadas. Este crescimento é caracterizado por um ponto máximo de crescimento para uma temperatura entre 70% e 80% da gama de valores de temperatura em que a bactéria se desenvolve, um pH usualmente entre 65% e 75% da gama de pH em que se desenvolve e uma atividade de água aproximada de 90%. Para a *Aeromonas hydrophila*, estes valores são concretamente 71.4%, 72.4% e 92.3%, respetivamente. A diminuição da temperatura provoca um rápido decréscimo no valor de  $\mu_{\max}$  assim como a diminuição do pH e da atividade de água ainda que não tão abrupta. O valor máximo de  $\mu_{\max}$  atingido é aproximadamente de 0.6.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

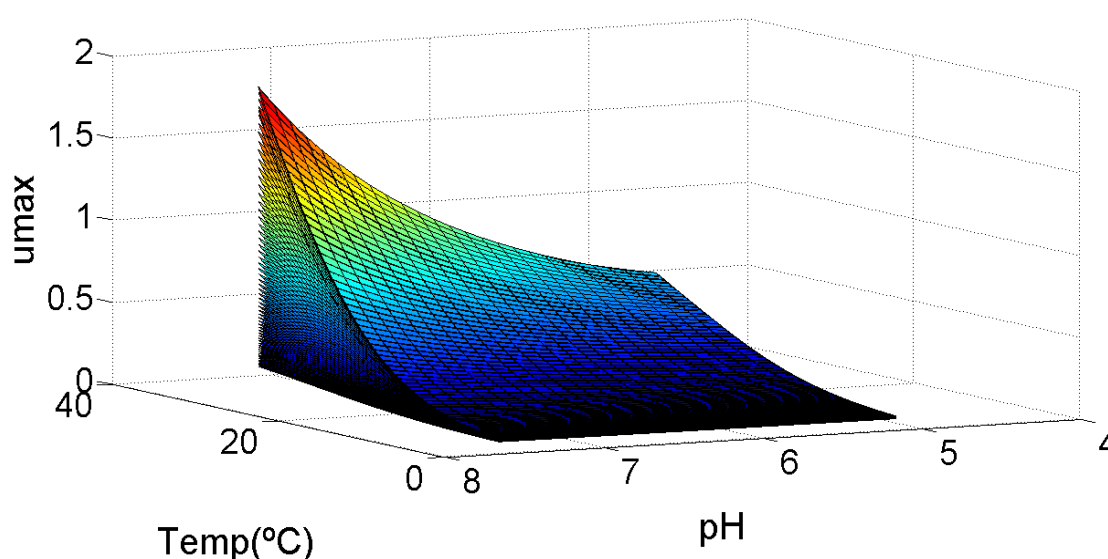


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

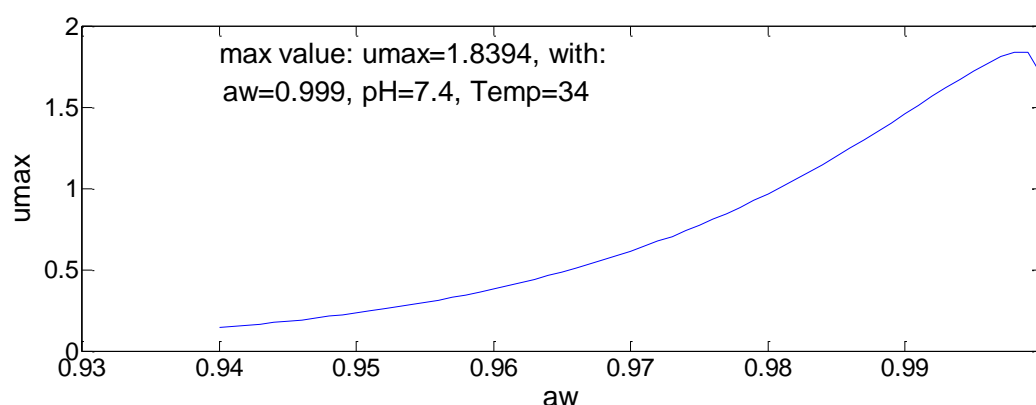
Figura 34 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Aeromonas hydrophila*.

***Bacillus cereus***

O modo como a temperatura, o pH e a  $a_w$  influenciam o crescimento desta bactéria é distinto de todos os outros observados. Para a *Bacillus cereus*, o declive máximo é tanto maior quanto maior for a temperatura e o pH, sendo que para a atividade de água apenas decresce quando esta atinge valores superiores a 0.999, o que numa situação prática pode ser desprezado. O declive máximo do crescimento desta bactéria atinge um valor de 1.8 log(CFU/g)/h, que é o mais alto de todos os microrganismos avaliados. É também de notar que os valores deste declive são relativamente baixos (cerca de 0.5 log(CFU/g)/h) enquanto a temperatura é inferior a 25°C, o pH inferior a 5.5 e a  $a_w$  menor que 0.97. Um pequeno aumento destes valores provoca um rápido aumento do declive máximo.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

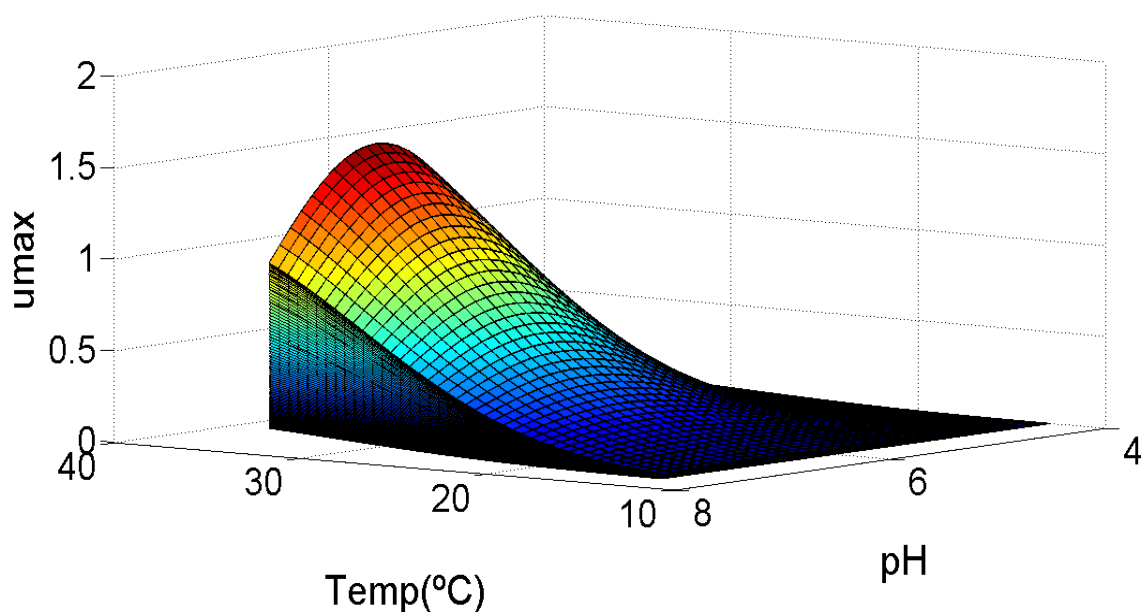


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

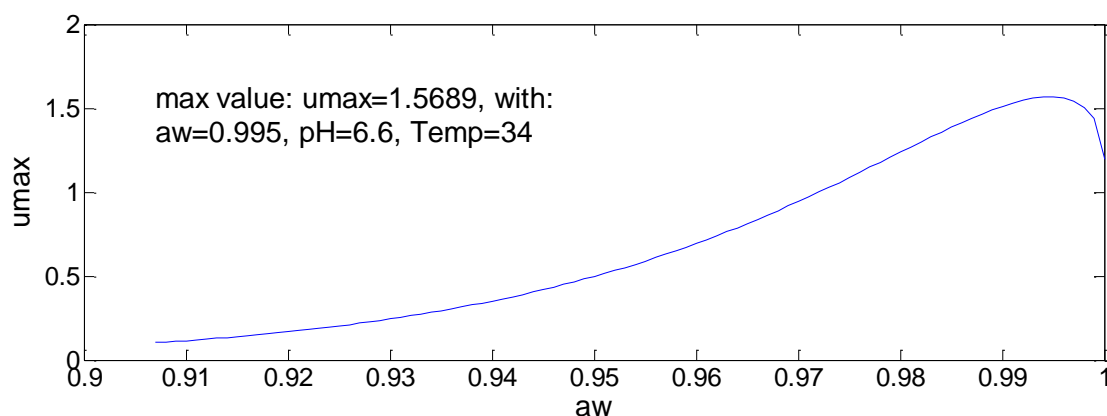
Figura 35 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Bacillus cereus*.

***Bacillus licheniformis***

Para esta bactéria, o gráfico demonstra uma evolução do declive máximo semelhante ao apresentado para a *Aeromonas hydrophila*. A principal diferença entre a bactéria referida anteriormente e a *Bacillus licheniformis* é que enquanto o declive máximo da primeira aumentava até cerca de 73% da gama de valores de temperatura, para a segunda bactéria o valor de temperatura para o qual  $\mu_{\max}$  é máximo equivale ao valor máximo de temperatura no qual a bactéria se desenvolve (34°C). Os valores de pH e atividade de água que permitem um valor máximo de declive são 6.6 e 0.995, respetivamente, o que equivale a percentagens semelhantes às da primeira bactéria descrita com valores de 72% e 94%, respetivamente.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

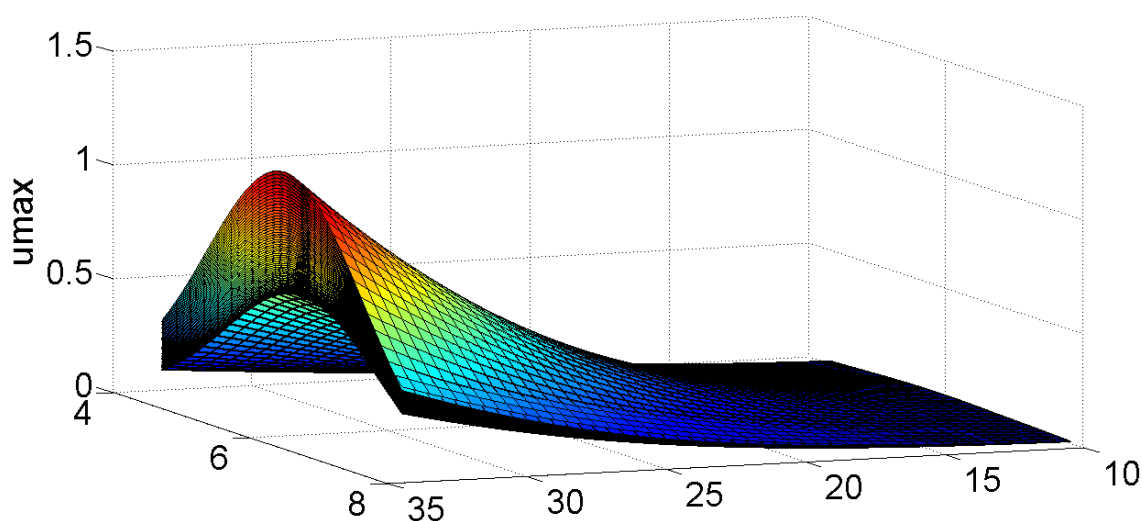


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

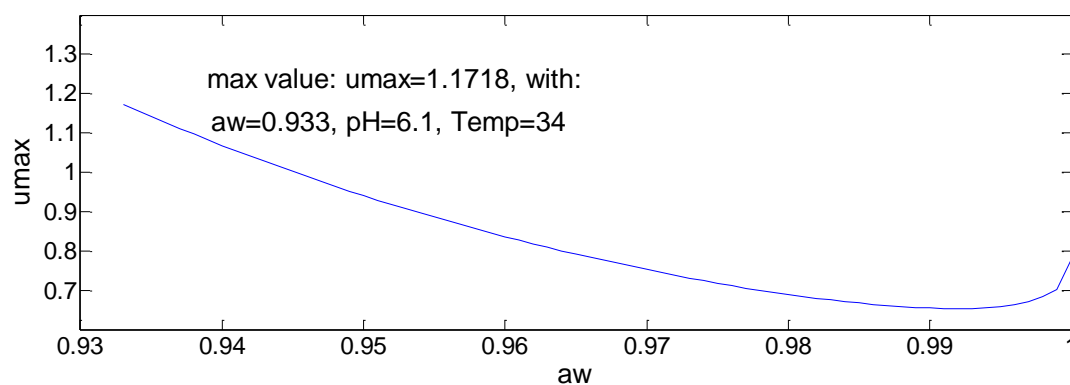
Figura 36 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Bacillus licheniformis*.

***Bacillus subtilis***

Das 14 bactérias analisadas, esta tem uma propriedade única. Ao contrário de todas as outras, em que o aumento do valor da atividade de água provoca um aumento no valor de  $\mu_{\max}$ , na *Bacillus subtilis* a reação é oposta. Até ser atingido o valor de  $a_w$  de 0.993, o declive máximo da curva de crescimento decresce com o aumento deste fator, e aumenta entre 0.993 e 1. Relativamente à temperatura, tal como nos dois casos anteriores, o seu aumento provoca um aumento no declive máximo. Já o pH provoca um aumento no aumento de  $\mu_{\max}$  até metade da gama de valores em que a bactéria se desenvolve e uma diminuição a partir desse valor, com um ritmo semelhante ao do aumento.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

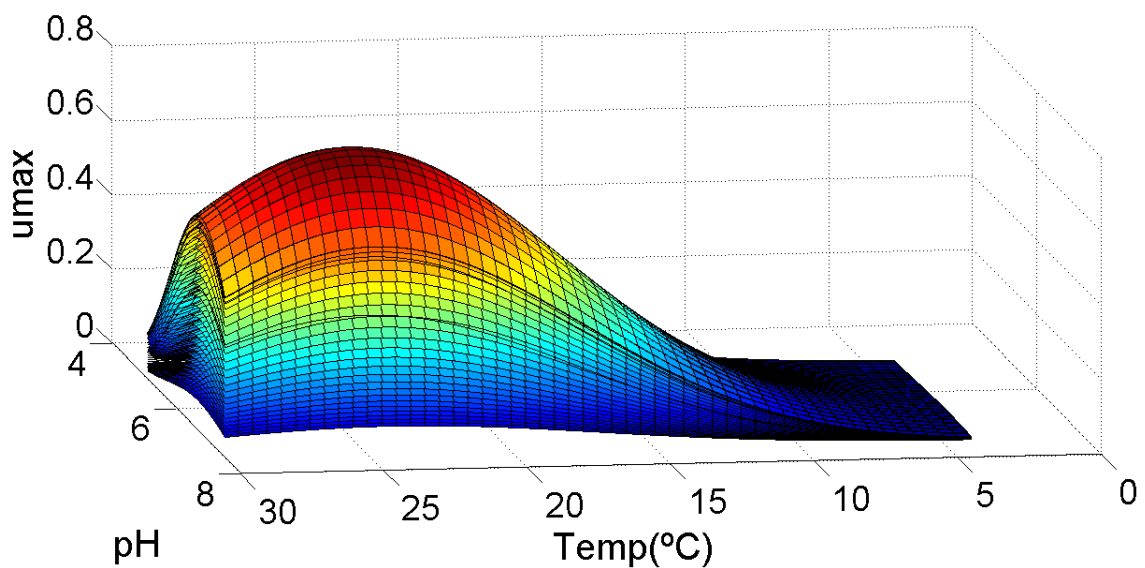


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

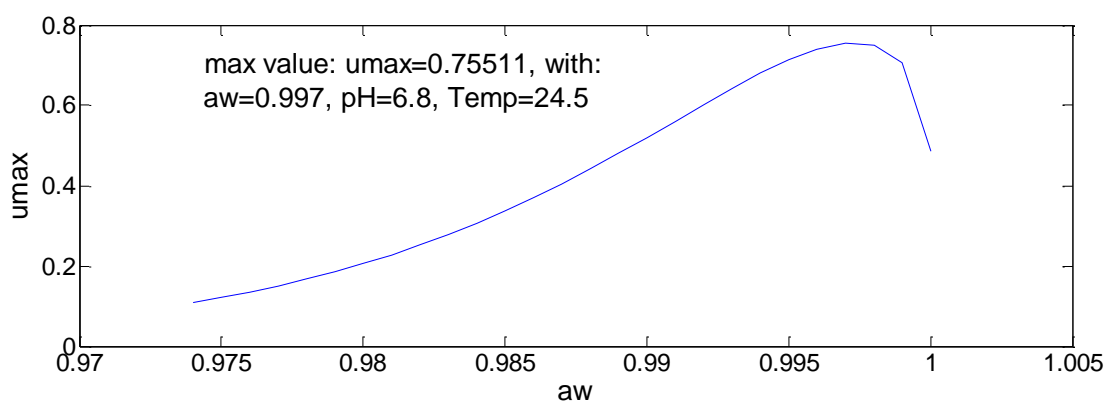
Figura 37 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Bacillus subtilis*.

### *Clostridium botulinum*

Como foi referido na descrição da bactéria *Aeromonas hydrophila*, existe uma curva nos gráficos apresentados que se identifica com diferentes bactérias no que diz respeito à influência da temperatura, atividade de água e pH no valor do declive máximo da curva de crescimento da bactéria em questão. *Clostridium botulinum* é um exemplo dessa curva, em que as percentagens da gama de valores de cada fator, para o qual o valor de  $\mu_{\max}$  é máximo, se encontram dentro dos valores referidos na bactéria descrita inicialmente - 78%, 70% e 88%, respetivamente para a gama de valores da temperatura, pH e atividade de água.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

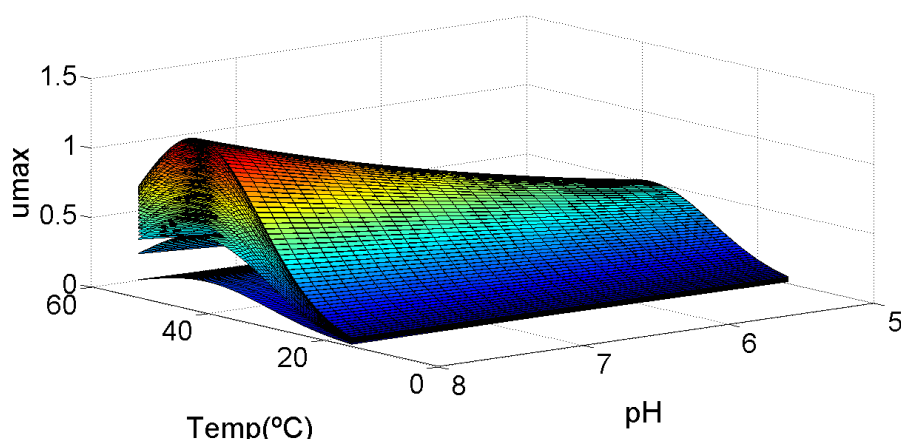


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

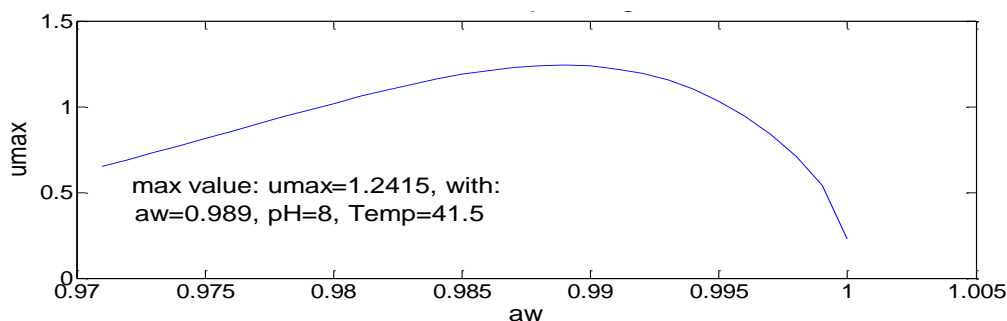
Figura 38 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Clostridium botulinum*.

***Clostridium perfringens***

Esta bactéria tem várias particularidades na relação entre o declive máximo de crescimento e os fatores intrínsecos e extrínsecos considerados. Iniciando pela temperatura, verifica-se que um aumento produz um aumento no declive máximo e que este aumento se torna mais acentuado com a aproximação do valor de temperatura para o qual é máximo, 41.5°C. Após atingir este valor, a diminuição do declive provocado pelo aumento da temperatura é feita a um ritmo lento. O pH é o principal responsável pela curva obtida ser distinta das que definem outras bactérias, uma vez que é usual o aumento do pH provocar um aumento de  $\mu_{\max}$  cada vez mais acentuado com a aproximação ao valor ótimo de pH. Para a *Clostridium perfringens*, o aumento do pH tem a mesma influência, mas o aumento é aproximadamente constante durante toda a gama de valores de pH. Consequentemente, o valor de pH que provoca um maior valor de declive máximo é também o valor máximo de pH igual a 8. A atividade de água tem igualmente uma curva peculiar, uma vez que o seu valor mínimo é atribuído a um valor aproximado de  $\mu_{\max}$  de 0.6, que aumenta com o aumento deste fator até atingir o valor máximo,  $a_w=0.989$  e  $\mu_{\max}=1.24$ , e a partir desse ponto diminui até atingir valores próximos de 0.2 quando a atividade de água tem um valor unitário.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

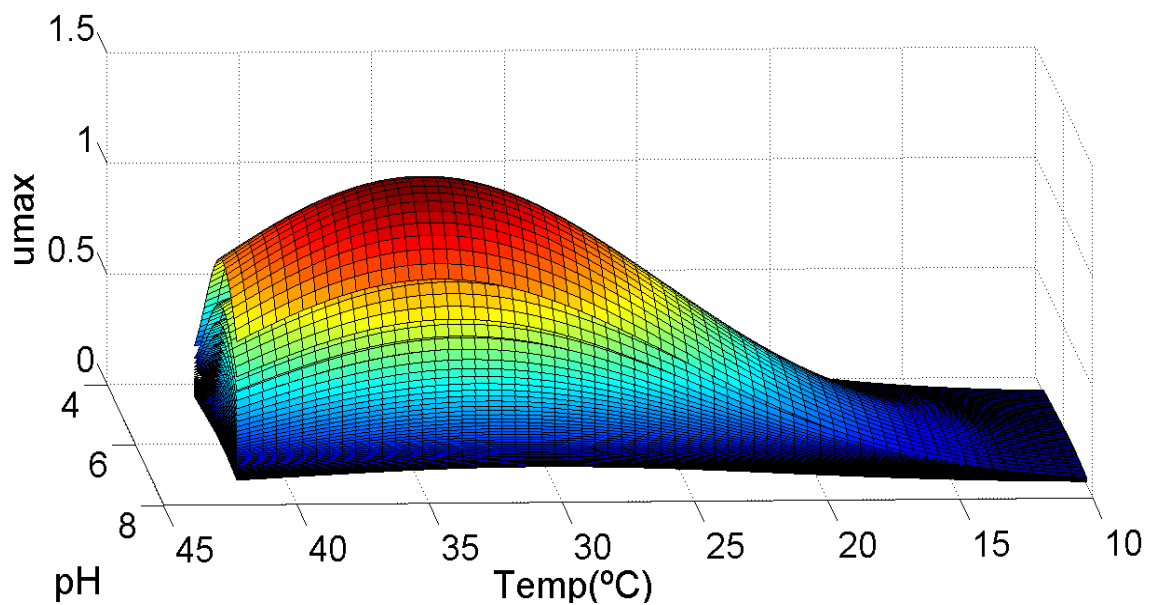


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

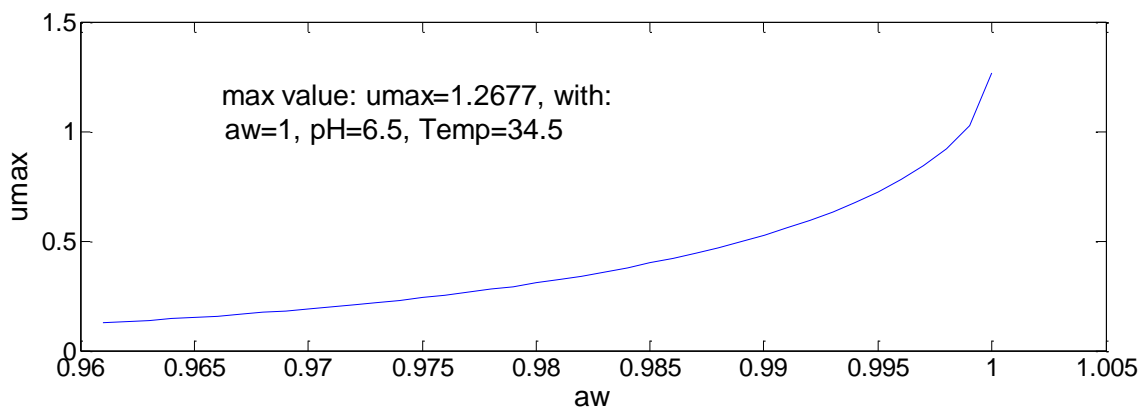
Figura 39 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Clostridium perfringens*.

### *Escherichia coli*

A influência da temperatura e do pH nesta bactéria é idêntica aos casos já identificados nas bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Clostridium botulinum*, em que as percentagens se encontram dentro dos limites identificados para este tipo de curva. Para este caso, é atingido o valor máximo do declive máximo a 76% da gama de valores de temperatura para os quais a bactéria se desenvolve e 66.7% da mesma margem de valores referente ao pH. O declive máximo desta bactéria é obtido quando a atividade de água atinge o seu valor máximo,  $a_w=1$ , sendo esta a única bactéria em que um aumento do declive máximo está diretamente relacionado com um aumento da atividade de água para toda a sua gama de valores.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{max}$ .

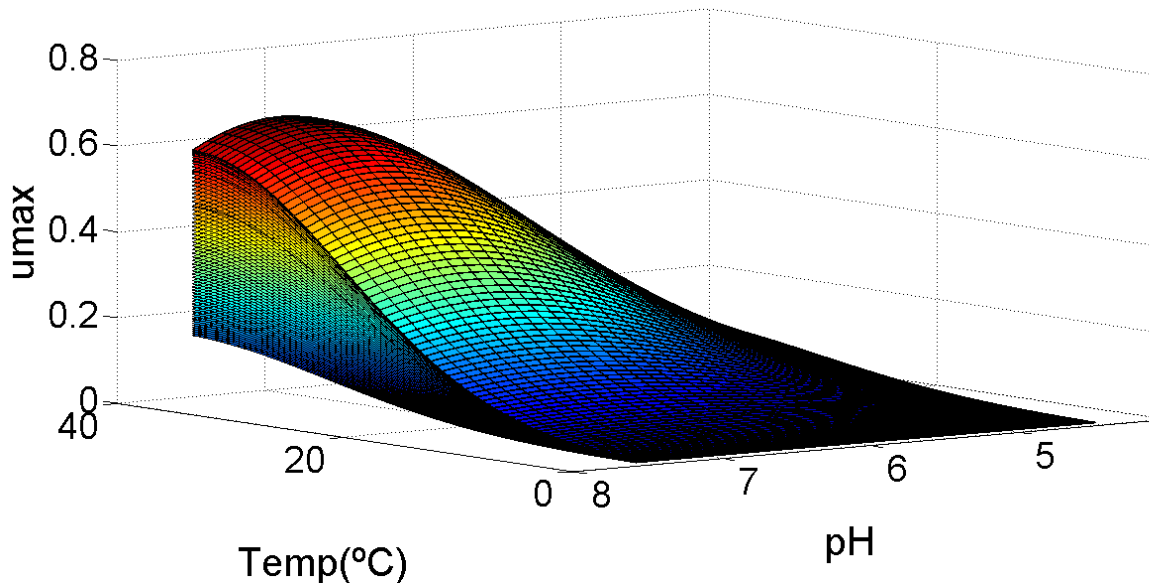


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{max}$  e o valor de  $a_w$ .

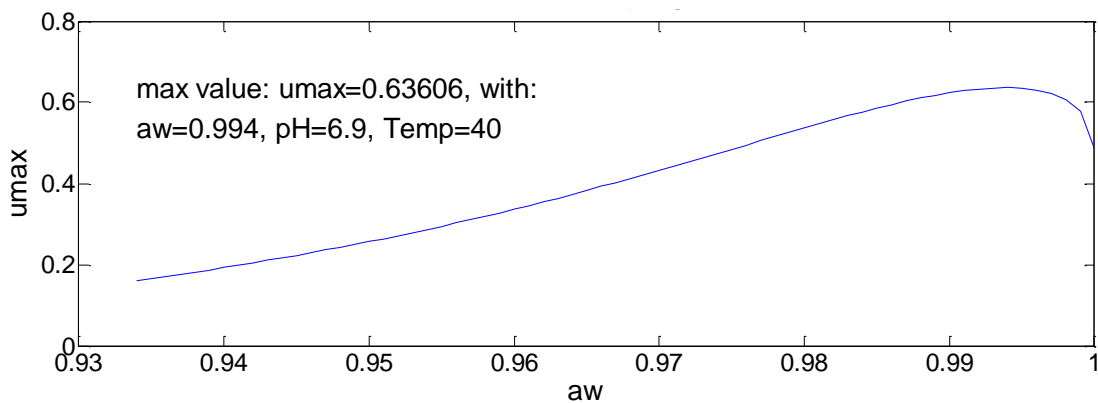
Figura 40 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Escherichia coli*.

***Listeria monocytogenes***

A *Listeria monocytogenes* apresenta uma curva semelhante à da *Aeromonas hydrophila*, com a diferença do valor ótimo de temperatura ser igual ao seu valor máximo (40°C). Os valores de pH e da atividade de água, para os quais  $\mu_{\max}$  é máximo, são respectivamente 6.9 e 0.994, o que, traduzido em percentagem, equivale a 80% e 90% da gama de valores para cada fator.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .



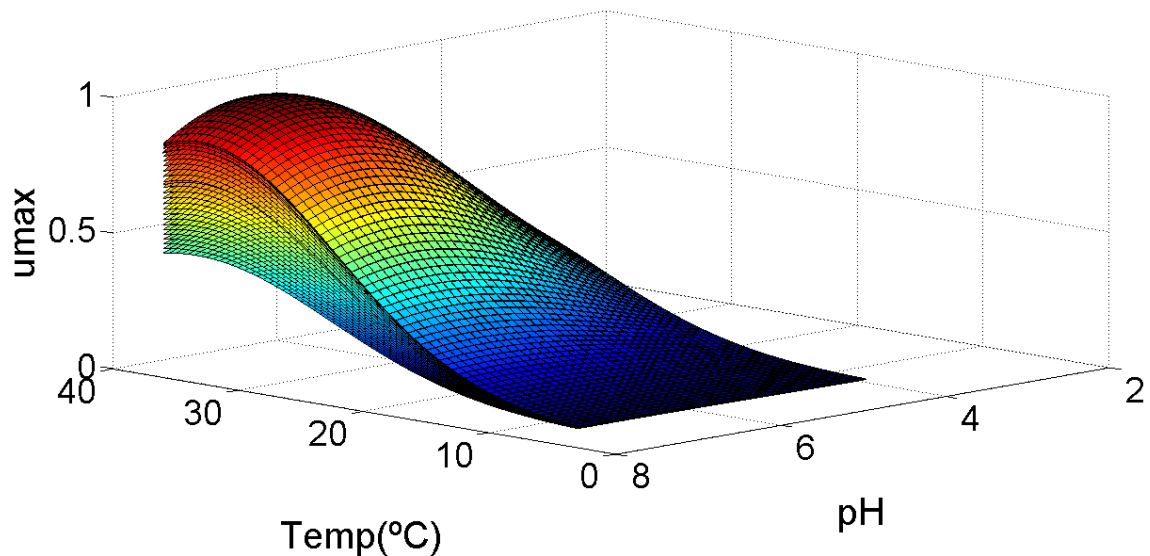
(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

Figura 41 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes*.

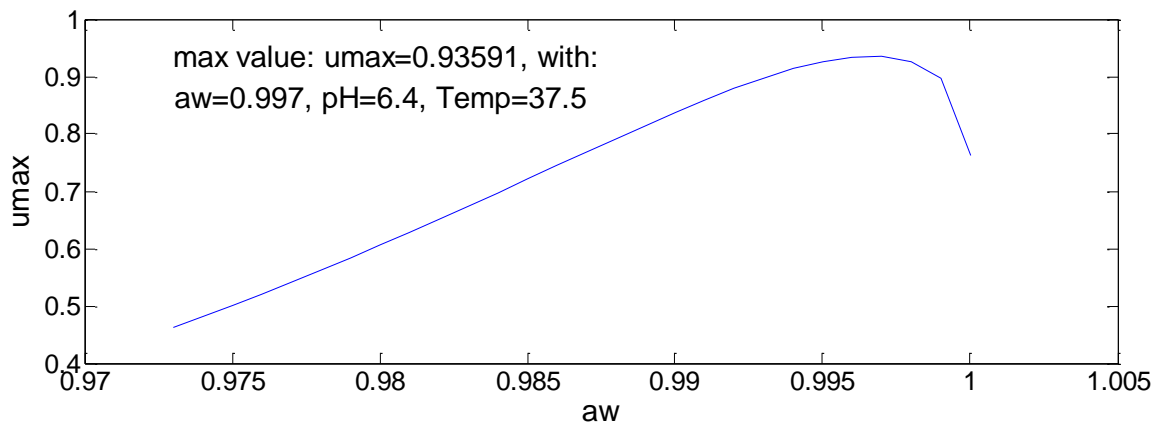


**Salmonella**

Esta bactéria é em tudo semelhante à anterior, diferenciando apenas nos valores de declive máximo em que a *Listeria monocytogenes* atingia um valor máximo de 0.63 e a *Salmonella* ultrapassa o valor 0.93. Este valor é atingido com a temperatura e a atividade de água a cerca de 90% da gama de valores respetiva, enquanto o pH ótimo corresponde a um valor na casa dos 70%.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

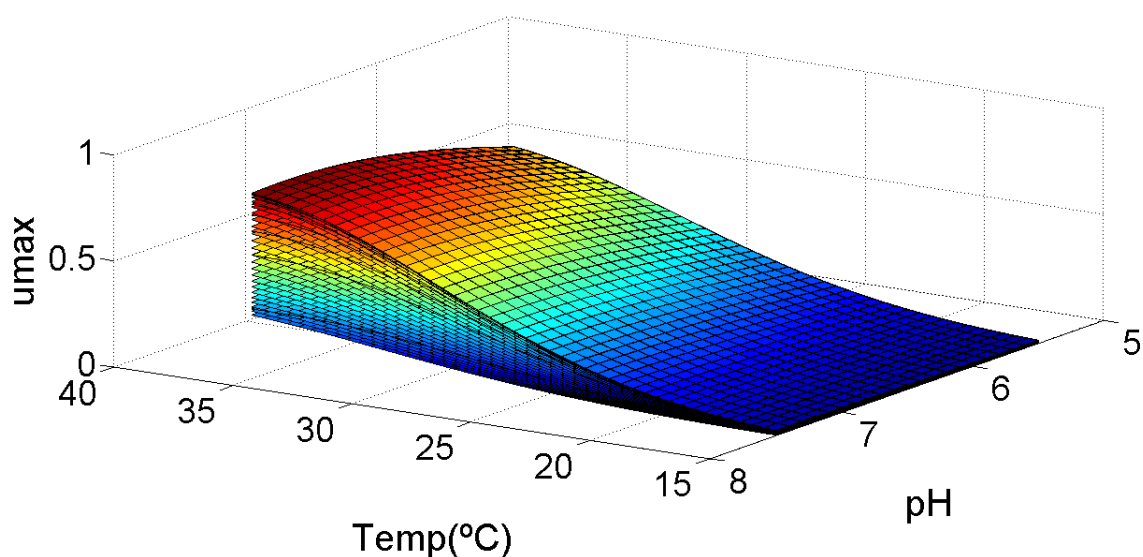


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

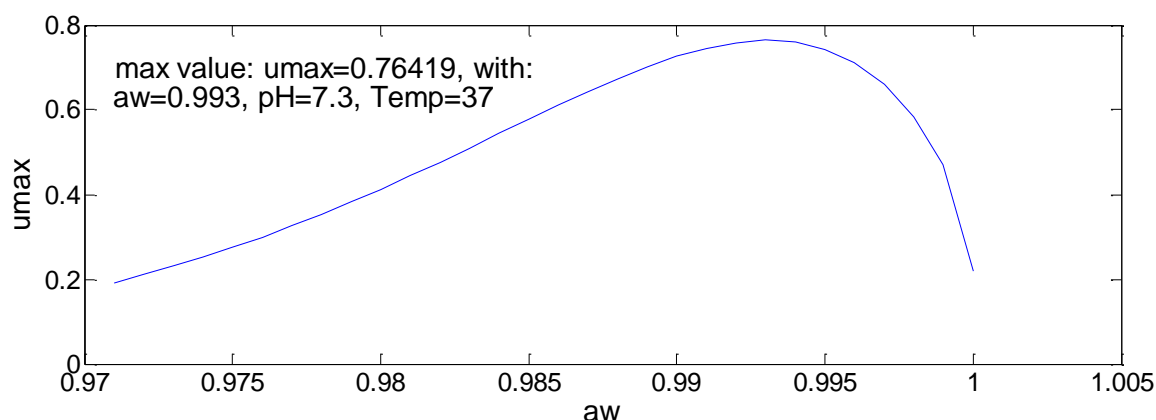
Figura 42 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Salmonella*.

***Shigella flexneri***

A curva traçada para a *Shigella flexneri* apresenta uma relação direta e constante entre o aumento da temperatura e o aumento do declive máximo,  $\mu_{\max}$ , que atinge o seu valor máximo quando a temperatura também o atinge o seu,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ . A variação do valor de pH do seu valor mínimo para o valor máximo representa uma variação consideravelmente pequena (cerca de 25%) no valor de  $\mu_{\max}$ , o que justifica o formato da curva que relaciona esta grandeza com os parâmetros já referidos. A atividade de água tem uma curva quase simétrica, uma vez que o valor mínimo de  $\mu_{\max}$  é atingido para  $a_{w,\min}$ , mas também para  $a_{w,\max}$ , estando em  $a_w=0.993$  o pico que define o valor máximo do declive máximo (0.76).



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

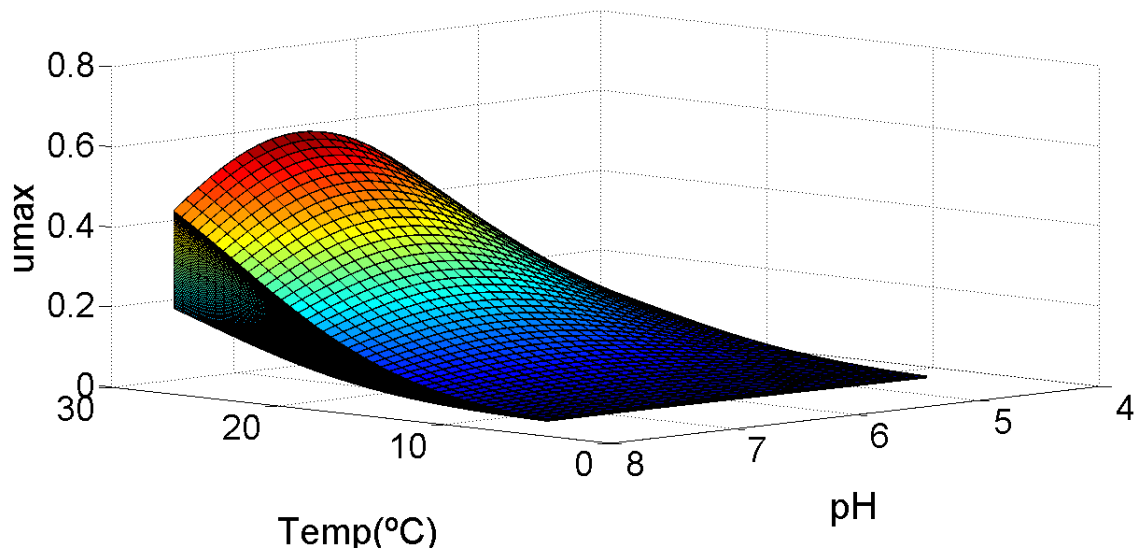


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

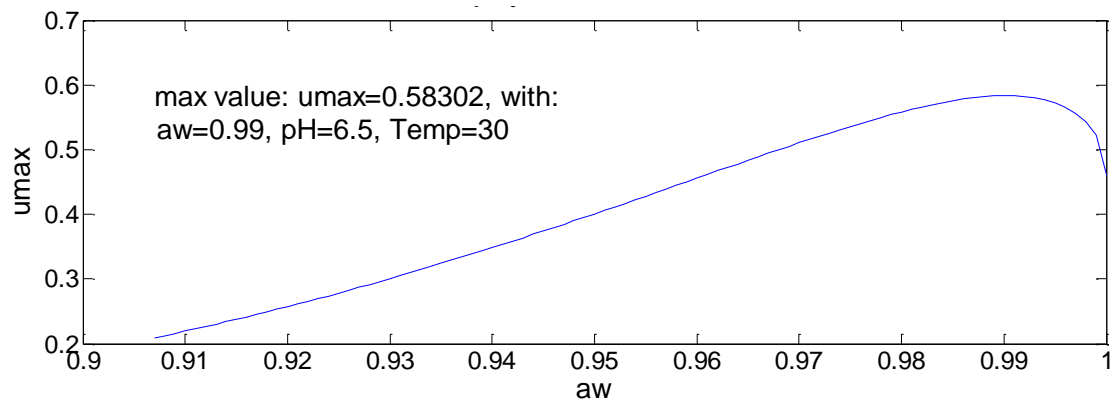
Figura 43 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Shigella flexneri*.

***Staphylococcus aureus***

A bactéria *Staphylococcus aureus* apresenta uma curva que é igualmente descrita por outras bactérias aqui analisadas. Esta curva é caracterizada por uma temperatura ótima igual à temperatura máxima, um pH ótimo por volta dos 60% do intervalo no qual o pH é considerado, e uma atividade de água entre 80% e 90% da gama de valores utilizados. Para este caso específico, estas percentagens são de 67.7% para o pH e de 89% para a atividade de água, o que juntamente com a temperatura igual a 30°C resulta num declive máximo igual a 0.58.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

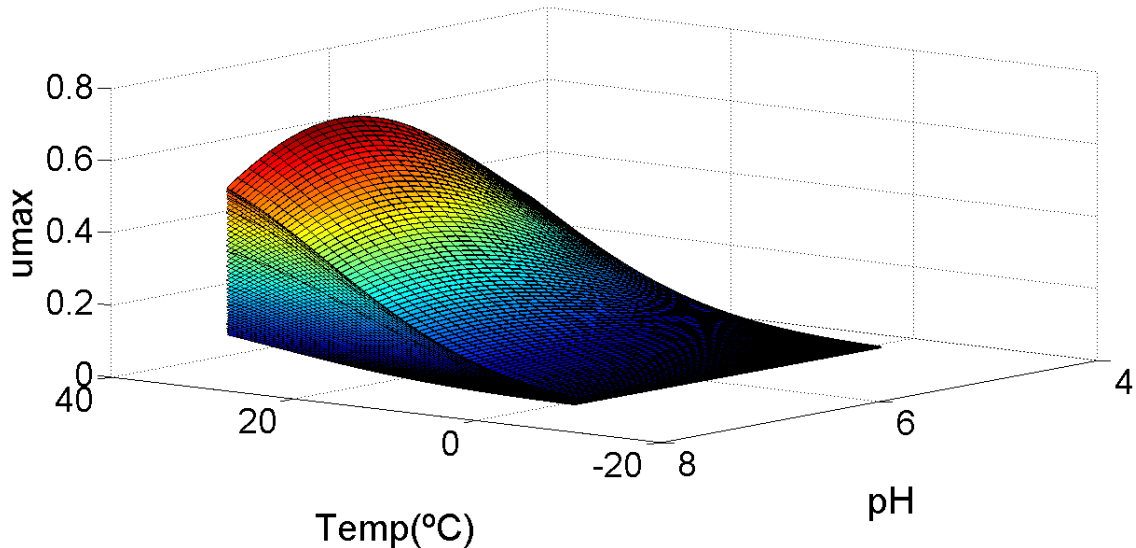


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

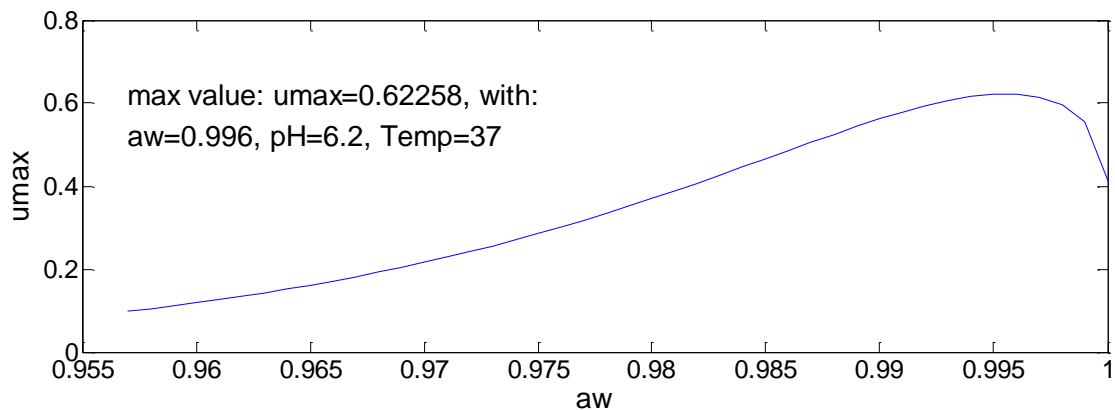
Figura 44 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*.

***Yersinia enterocolitica***

O gráfico resultante para esta bactéria é em tudo semelhante ao gráfico descrito para a *Staphylococcus aureus* e, por isso, não precisa de ser novamente descrito, com a exceção de uma pequena alteração das percentagens da gama de valores utilizados para as quais é máximo o declive máximo da curva de crescimento, 100% para temperatura (37°C), 64% para o pH (6.2) e 90% para a atividade de água (0.996). O valor de  $\mu_{\max}$  obtido para estes parâmetros é igual a 0.66.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

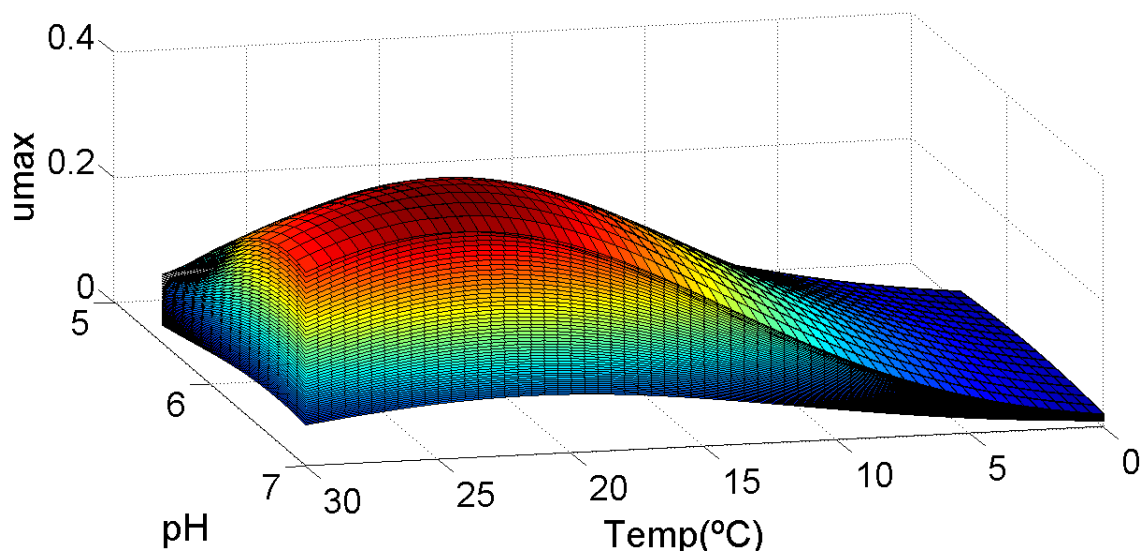


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

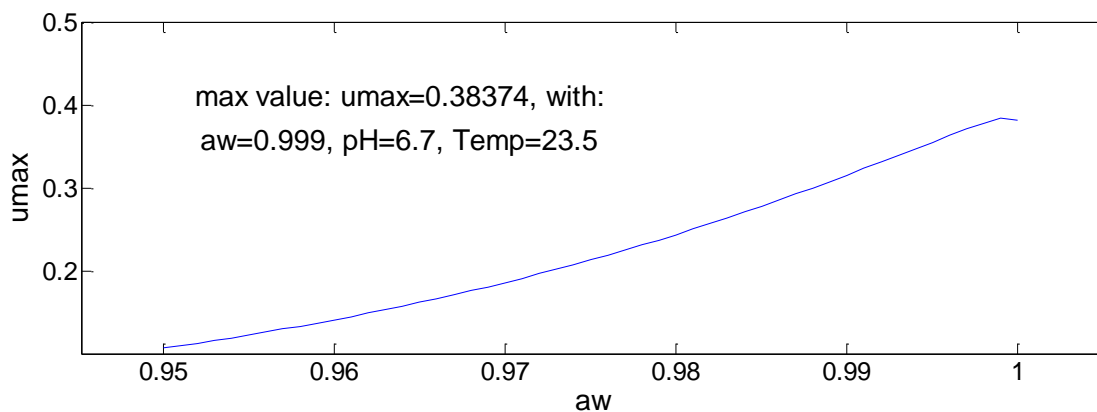
Figura 45 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Yersinia enterocolitica*.

***Brochothrix thermosphacta***

O microrganismo *Brochothrix thermosphacta* é mais uma das bactérias relacionadas com a *Aeromonas hydrophila*, por terem curvas de crescimento de  $\mu_{\max}$  semelhantes. É no entanto importante destacar o valor da atividade de água para o qual o valor de  $\mu_{\max}$  é máximo, uma vez que é muito próximo do valor máximo possível ( $a_w=0.999$  sendo o máximo possível  $a_w=1$ ). Os valores de temperatura e pH estão ambos perto dos 80% da gama de valores, na qual cada fator está definido, e permitem obter um valor máximo do declive máximo de 0.38.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .

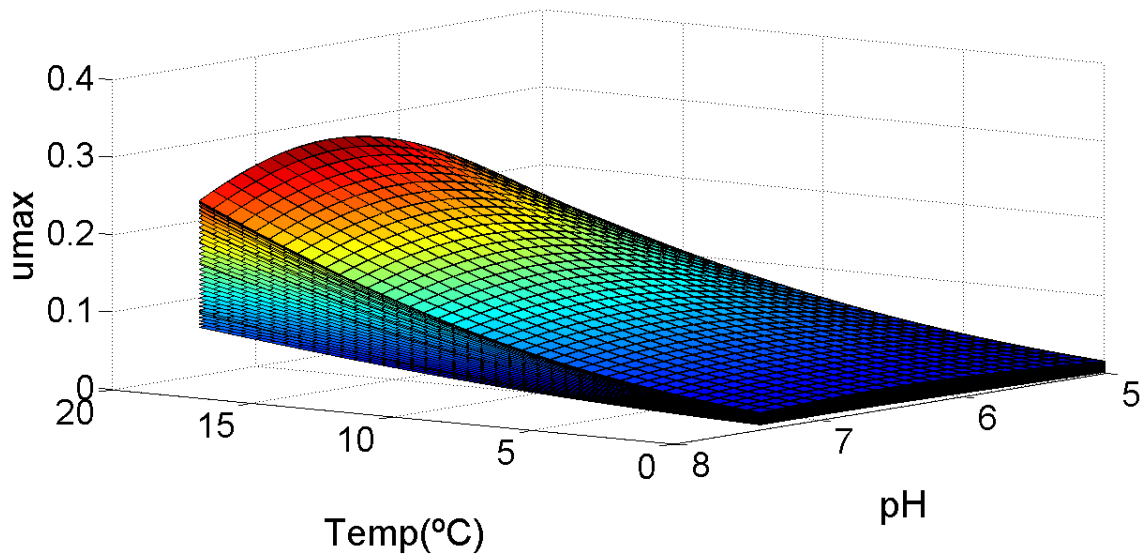


(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

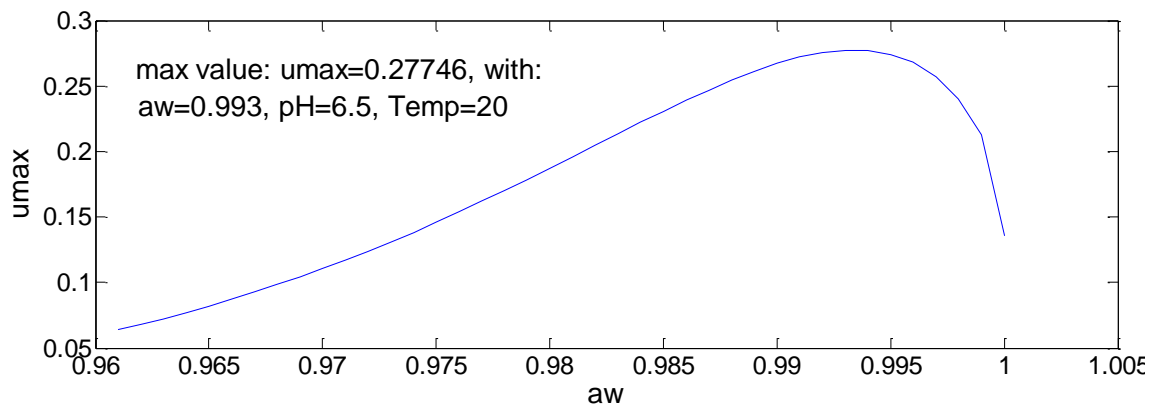
Figura 46 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Brochothrix thermosphacta*.

***Pseudomonas***

Já explicita na descrição do gráfico de *Staphylococcus aureus*, a curva produzida por esta bactéria dispensa apresentações, uma vez que é igual à do microrganismo referido. Tal como para *Yersinia enterocolitica*, o declive máximo é máximo quando a temperatura atinge o valor mais elevado da gama de valores definidos, enquanto o pH ronda os 60% e a atividade é ligeiramente mais baixa que nas outras bactérias, 82%. O maior valor de  $\mu_{\max}$  é o valor mais baixo das bactérias analisadas e é igual a 0.28.



(a) Relação entre temperatura, pH, atividade de água e  $\mu_{\max}$ .



(b) Relação entre o valor máximo de  $\mu_{\max}$  e o valor de  $a_w$ .

Figura 47 - Influência dos fatores intrínsecos e extrínsecos no declive máximo de crescimento da bactéria *Pseudomonas*.

### Discussão de resultados

Após a análise realizada para as 14 bactérias, verifica-se que apesar dos valores de cada fator considerado - temperatura, pH e atividade de água - ter valores mínimos, máximos e ótimos distintos entre as várias bactérias, assim como os valores máximos de  $\mu_{\max}$ , algumas das bactérias podem ser agrupadas tendo em conta a curva que relaciona os 4 parâmetros identificados e a relação entre os fatores intrínsecos e extrínsecos que permite obter o maior valor de  $\mu_{\max}$ . Uma vez que cada fator tem um valor mínimo e máximo diferente para cada bactéria, é usada uma adimensionalização obtida através da equação (13), para tornar mais simples e perceptível a comparação entre bactérias, em que a variável X tanto pode ser a temperatura como o pH.

$$X_{\%opt} = \frac{X_{opt} - X_{min}}{X_{max} - X_{min}} * 100 \quad (13)$$

As bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* são caracterizadas por  $T_{\%opt} = [70\%, 80\%]$  e  $pH_{\%opt} = [65\%, 80\%]$  e são agrupadas numa categoria.

Outra categoria é composta pelas bactérias em que  $T_{\%opt} = T_{\max}$ , isto é,  $T_{\%opt} = 100\%$  e  $pH_{\%opt} = [50\%, 70\%]$ . Estes casos manifestam-se em bactérias como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Pseudomonas*.

A *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella* são um dos casos em que há uma mistura das duas categorias anteriores. Por um lado, a  $T_{\%opt}$  é superior a 90%, por outro, o  $pH_{\%opt}$  tem valores mais elevados que os considerados na segunda categoria apresentada,  $pH_{\%opt} = [70\%, 80\%]$ . Um caso específico desta categoria é a bactéria *Shigella flexneri*, que mantém o valor de  $T_{\%opt} = 100\%$  mas tem o valor de  $pH_{\%opt} > 90\%$ .

A bactéria *Bacillus cereus* é um caso extremo do último exemplo, uma vez que se verifica  $T_{\%opt}=pH_{\%opt}=100\%$ . Para além deste microrganismo, também a *Clostridium perfringens* apresenta um caso único em que  $T_{\%opt}=70\%$ , como na primeira categoria apresentada, mas com  $pH_{\%opt}=100\%$ .

Relativamente à influência da atividade de água, é usual considerar que um aumento da atividade de água do ambiente implica um crescimento bacteriano mais rápido (Gaspar *et al.* 2009). É no entanto possível visualizar nos gráficos anteriores que com a aproximação do valor máximo de  $a_w$ , essa condição é alterada. Com a exceção da bactéria *Bacillus cereus*, em que se verifica uma diminuição do declive máximo com o aumento de  $a_w$ , e da bactéria *Escherichia coli*, onde se verifica o aumento até ao valor máximo de  $a_w$ , nas restantes bactérias o aumento da atividade de água provoca um aumento no declive máximo mas só até atingir um determinado valor, a partir do qual é provocado um decréscimo de  $\mu_{max}$ . A este valor é chamado  $a_{w,opt}$ . Na Tabela 13, adaptada de Gaspar *et al.* (2009) e ComBase (2015), foram introduzidos os valores obtidos no estudo feito durante esta dissertação relativamente ao crescimento microbiano. Nessa tabela são apresentados os valores mínimos, máximos e ótimos da temperatura, pH e atividade de água, para os quais a bactéria se desenvolve, assim como a UFC/g inicial, final e infetante para cada microrganismo.



Tabela 13. Parâmetros mínimos, máximos e ótimos para o crescimento bacteriano.

Microrganismo	$T_{\min}$ [°C]	$T_{\text{opt}}$ [°C]	$T_{\max}$ [°C]	pH <sub>min</sub>	pH <sub>opt</sub>	pH <sub>max</sub>	$a_{w,\min}$	$a_{w,\text{opt}}$	$a_{w,\max}$	$\mu_{\max,\text{opt}}$	Colônia inicial [UFC/g]	Colônia infectante [UFC/g]	Colônia final [UFC/g]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	27	37	4.6	6.7	7.5	0.974	0.998	1	0.60732	10 <sup>3</sup>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7.39</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	5	34	34	4.9	7.4	7.4	0.94	0.999	1	1.8394	10 <sup>1</sup>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7.61</sup>
<i>Bacillus licheniformis</i>	13	34	34	4	6.6	7.6	0.907	0.995	1	1.5689	10 <sup>3</sup>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7.83</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	10	34	34	4.3	6.1	7.8	0.933	0.933	1	1.1780	10 <sup>1</sup>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>7.83</sup>
<i>Clostridium botulinum</i>	4	24.5	30	5.1	6.8	7.5	0.974	0.997	1	0.75511	10 <sup>0</sup>	>10 <sup>4</sup>	10 <sup>7.04</sup>
<i>Clostridium perfringens</i>	15	41.5	52	5.0	8.0	8.0	0.971	0.989	1	1.24150	10 <sup>1</sup>	>10 <sup>6</sup>	10 <sup>7.61</sup>
<i>Escherichia coli</i>	10	34.5	42	4.5	6.5	7.5	0.961	1	1	1.26770	10 <sup>2</sup>	>10 <sup>6</sup>	10 <sup>8.7</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	40	40	4.4	6.9	7.5	0.934	0.994	1	0.63606	10 <sup>1</sup>	>10 <sup>2</sup>	10 <sup>8.52</sup>
<i>Salmonella</i>	7	37.5	40	3.9	6.4	7.4	0.973	0.997	1	0.93591	10 <sup>2</sup>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>8.52</sup>
<i>Shigella flexneri</i>	15	37	37	5.5	7.3	7.5	0.971	0.993	1	0.76419	10 <sup>0</sup>	>10 <sup>2</sup>	10 <sup>8.78</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5	30	30	4.4	6.5	7.5	0.907	0.99	1	0.58302	10 <sup>1</sup>	>10 <sup>5</sup>	10 <sup>8.09</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1	37	37	4.4	6.2	7.2	0.957	0.996	1	0.662258	10 <sup>2</sup>	>10 <sup>7</sup>	10 <sup>8.3</sup>
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0	23.5	30	5.5	6.7	7.0	0.95	0.999	1	0.38374	10 <sup>2</sup>	>10 <sup>7</sup>	10 <sup>7.83</sup>
<i>Pseudomonas</i>	0	20	20	5.0	6.5	7.4	0.961	0.993	1	0.27746	10 <sup>2</sup>	>10 <sup>7</sup>	10 <sup>8.26</sup>

### 4.3. Testes a temperatura de refrigeração

#### Medições efetuadas

Como descrito na secção 3.5, foi utilizado o datalogger EL-USB-2-LCD+ para armazenar dados referentes à medição da temperatura e da humidade relativa do ar num frigorífico doméstico. O estudo foi realizado durante 118 horas, com aquisição de dados a cada 5 minutos. Com o software disponibilizado pela Lascar Electronics, juntamente com o datalogger, foram recolhidos os dados guardados no datalogger referentes às medições da temperatura e da humidade relativa, assim como a data em que foi realizada cada medição e exportados para um ficheiro Excel.

Os dados obtidos são apresentados na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**, onde é utilizado o interface gráfico criado para ler os valores guardados e construir os gráficos correspondentes (ver Figura 49). Ao interface gráfico apresentado na secção 3.4.4, foi acrescentado um botão no canto inferior direito que permite ao utilizador abrir numa nova janela o gráfico apresentado no interface e analisá-lo com maior pormenor, como é apresentado na Figura 50.

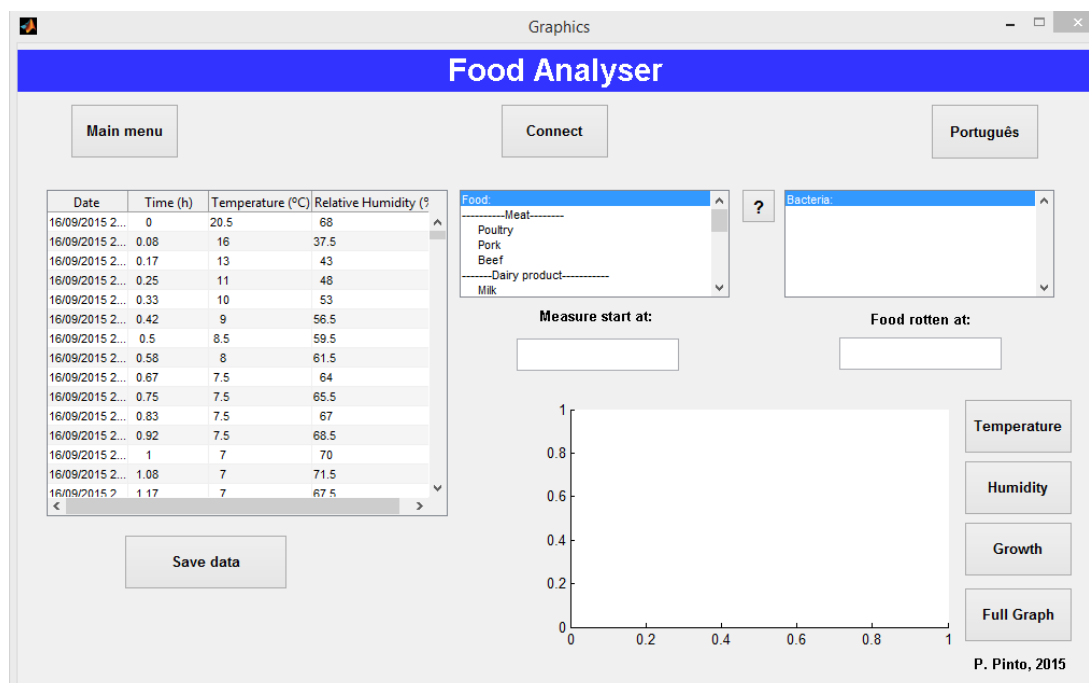
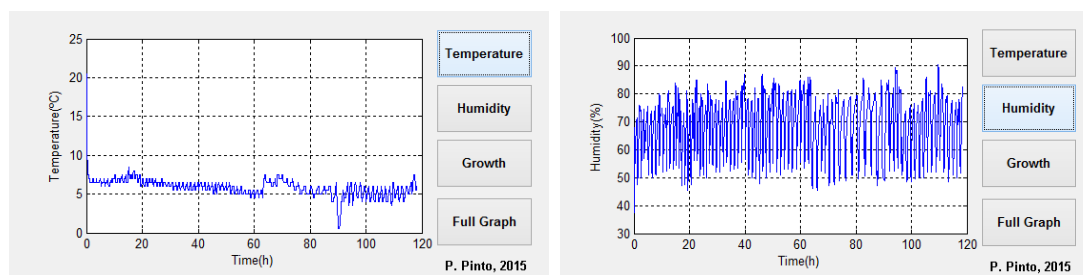


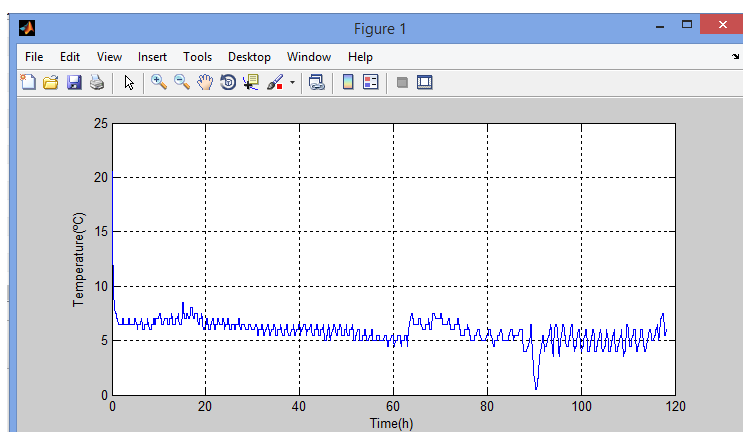
Figura 48 - Leitura das medições efetuadas pelo datalogger.



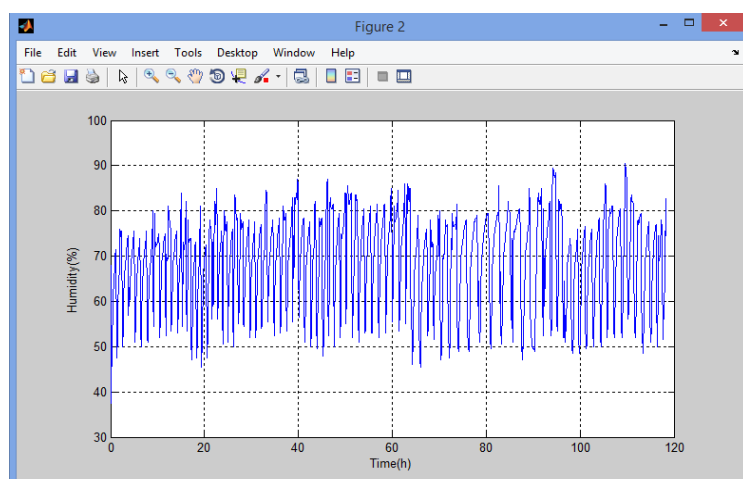
(a) Gráfico da temperatura em função do tempo.

(b) Gráfico da humidade relativa em função do tempo.

Figura 49 - Gráficos referentes à temperatura e à humidade relativa medidos num frigorífico doméstico.



(a) Maximização do gráfico da temperatura.



(b) Maximização do gráfico da humidade relativa.

Figura 50 - Figuras apresentadas ao premir o botão 'Full Graph' do interface.

### Crescimento microbiano

Com o objetivo de testar o interface gráfico criado e analisar o crescimento bacteriano nos produtos alimentares que este dispositivo tem capacidade de avaliar, foi simulado que todos esses produtos tenham estado presentes no frigorífico enquanto as medições de temperatura e humidade foram feitas. Uma vez que os testes realizados duraram apenas 118h, o que equivale a pouco menos de 5 dias, a maioria das bactérias não atingiu a fase de estabilização, o que não permite visualizar o gráfico completo do seu crescimento. Para fazer uma análise completa das curvas de crescimento obtidas, foram acrescentados mais 7 dias de medições, considerando que a temperatura e a humidade se mantivessem iguais durante este período de tempo. Para analisar como se desenvolvem algumas bactérias nos ambientes estudados, são apresentados alguns exemplos de resultados obtidos no interface em questão.

### Análise da deterioração de carne de porco num frigorífico doméstico

Na Figura 51 é apresentado como exemplo o desenvolvimento da bactéria *Aeromonas hydrophila* em carne de porco quando sujeita às temperaturas apresentadas anteriormente.

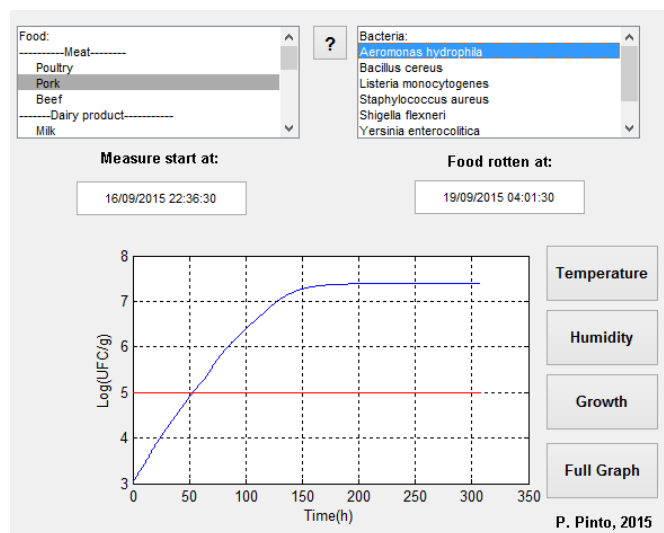


Figura 51 - Crescimento de *Aeromonas hydrophila* em carne de porco.

A representação gráfica mostra como a bactéria se desenvolve, sendo também exibido a vermelho o valor limite para o qual o número de bactérias se torna prejudicial à saúde. Este valor é atingido cerca de 50h depois da carne ter sido introduzida no frigorífico, o que

equivale a prever que cerca de 2 dias depois se torna imprópria para consumo devido à presença desta bactéria.

Apesar desta bactéria ser responsável pela deterioração do alimento em causa passadas 50h, não significa que este se encontre contaminado por todas as bactérias que lhe são associadas. Na Figura 52 e Figura 53, são ilustrados dois exemplos em que as bactérias não atingem as suas doses infetantes no período de tempo considerado. No primeiro caso, para a bactéria *Staphylococcus aureus* as condições em que se encontra permitem o seu crescimento, mas não a um ritmo suficiente para atingir a dose infetante durante 300h. Para a bactéria *Shigella flexneri*, o seu crescimento é nulo, uma vez que a temperatura não é suficiente para que se desenvolva. Na Figura 54 é representada a curva de crescimento da bactéria *Bacillus cereus* que, apesar de atingir o valor que a torna prejudicial, demora mais tempo do que a *Aeromonas hydrophila*.

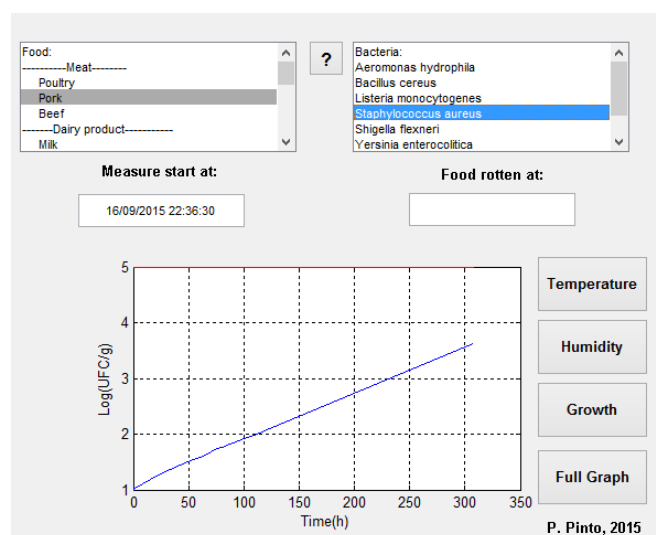


Figura 52 - Crescimento de *Staphylococcus aureus* em carne de porco.

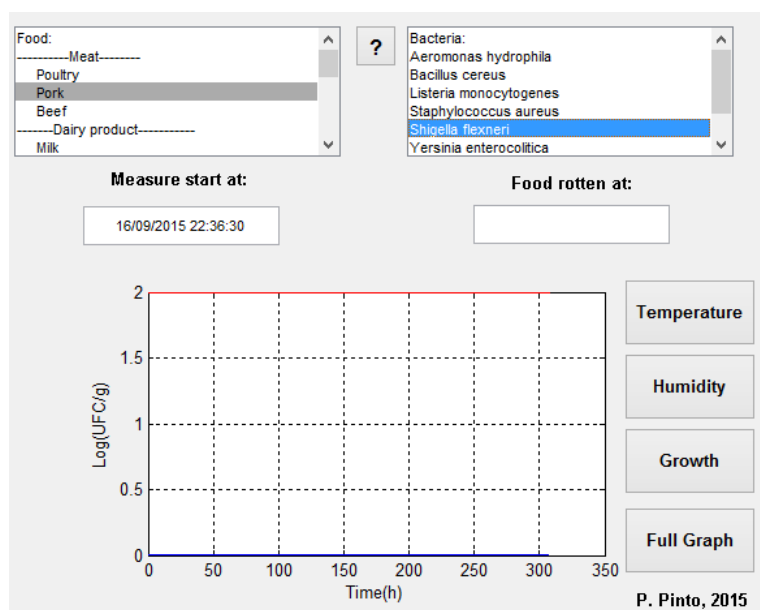


Figura 53 - Crescimento de *Shigella flexneri* em carne de porco.

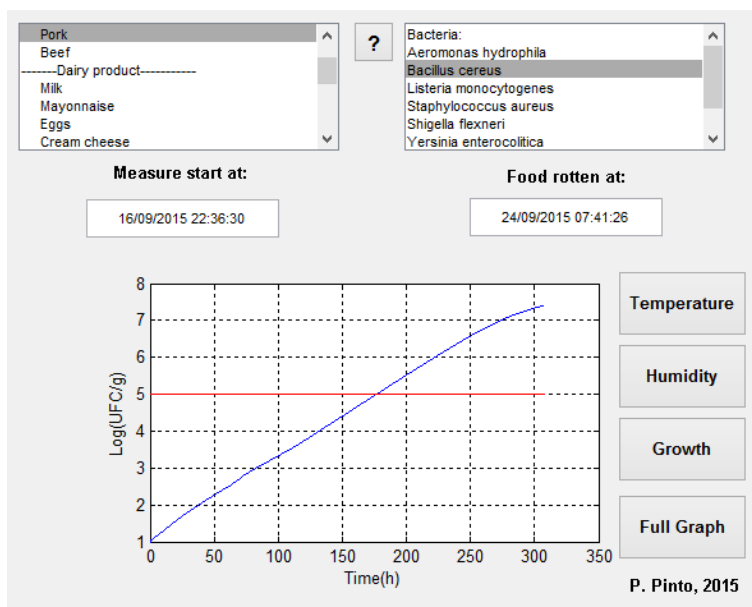


Figura 54 - Crescimento de *Bacillus cereus* em carne de porco.

### Análise da deterioração de peixe fresco num frigorífico doméstico

A mesma análise feita para carne de porco foi também realizada para peixe fresco e analisadas algumas das bactérias que se podem desenvolver nesse alimento.

Na Figura 55 está representado o crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes*, que atinge o seu valor infetante cerca de 100h depois de começar a ser analisada e torna o peixe prejudicial à saúde.

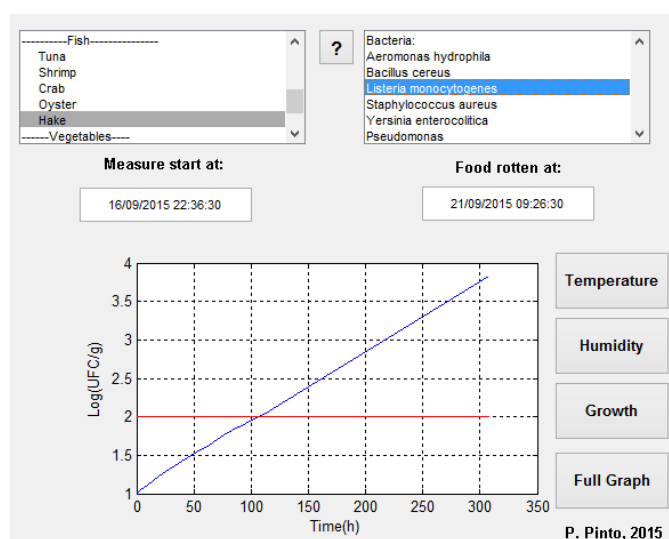


Figura 55 - Crescimento de *Listeria monocytogenes* em peixe fresco.

Para a Figura 56 foi escolhida a bactéria *Bacillus cereus*, tal como para a carne de porco, para demonstrar como o crescimento da mesma bactéria, sujeita à mesma temperatura, pode ser bastante diferente por se encontrar em alimentos diferentes. Para a carne de porco, esta bactéria demorou cerca de 170h a atingir o valor infetante (igual a 5 log(UFC/g)), no entanto, quando analisada em peixe fresco, demora cerca de 250h a atingir apenas 3 log(CFU/g). Este efeito é compreendido depois de analisar a diferença do valor de atividade de água para estes dois alimentos e a influência que a variação deste parâmetro intrínseco tem no crescimento da bactéria (ver secção 4.2).

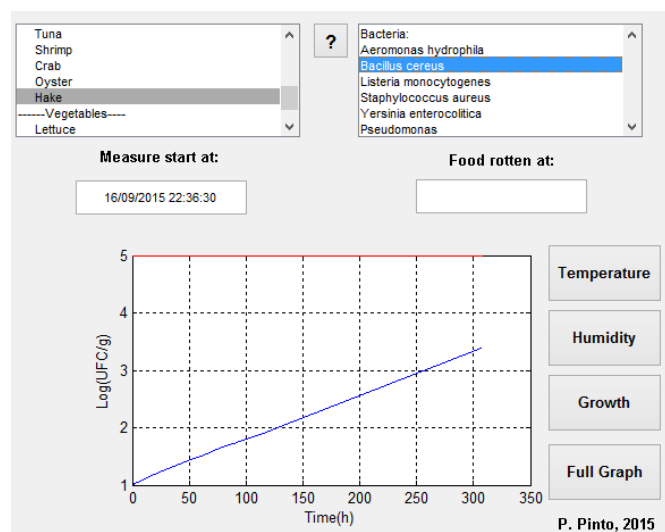


Figura 56 - Crescimento de *Bacillus cereus* em peixe fresco.

#### *Análise da deterioração de ovos num frigorífico doméstico*

A análise de ovos é representada pela única das bactérias analisadas que se desenvolve neste alimento para as temperaturas medidas, *Staphylococcus aureus*. Na Figura 57 é apresentado o crescimento dessa bactéria que não atinge, após 300h, a dose suficiente para deteriorar o alimento em causa.

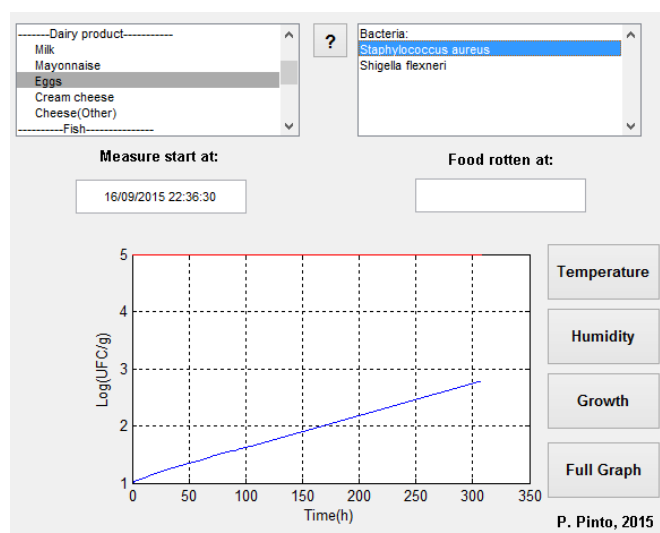


Figura 57 - Crescimento de *Staphylococcus aureus* em ovos.



#### **4.4. Nota conclusiva**

A utilização das fórmulas deduzidas nos capítulos anteriores, assim como os testes efetuados, permitiram analisar como é influenciado o crescimento bacteriano pelos fatores intrínsecos e extrínsecos do ambiente onde a bactéria se encontra. Esta análise permitiu avaliar como cada bactéria reage à alteração da temperatura, atividade de água e pH, tirar conclusões sobre a sua curva de crescimento e concluir que as 14 bactérias estudadas podem ser divididas entre vários grupos caracterizados pelo modo como o declive máximo de crescimento é influenciado pelos fatores descritos.

O interface gráfico criado verificou-se útil na comparação do crescimento microbiano entre vários alimentos e entre várias bactérias. Após ter sido testado, a conclusão a tirar é que este dispositivo, juntamente com o interface gráfico referido, tem a capacidade de contribuir para a diminuição do desperdício alimentar, uma vez que as entidades responsáveis por áreas de restauração têm uma melhor noção da qualidade dos produtos que possuem nos equipamentos de refrigeração, a partir do controlo do número UFC/g das diferentes bactérias presentes em cada alimento.

## 5. Conclusões

### 5.1. Considerações gerais

Ao analisar as causas responsáveis pelo desperdício alimentar, assim como os valores estimados de comida desperdiçada, existe interesse em desenvolver métodos, procedimentos, tecnologias que possam ser colocadas ao serviço da população para combater este flagelo. A quantidade de comida desperdiçada, devido à sua deterioração, foi um incentivo para criar um dispositivo capaz de prever quando um alimento se torna impróprio para consumo.

Nesta dissertação foi construído um dispositivo que pretende suplantiar os dataloggers de temperatura e humidade relativa já existentes no mercado destinados à monitorização destas grandezas em equipamentos de refrigeração onde se encontram produtos alimentares, com o objetivo de avaliar e controlar a segurança alimentar. Estes dispositivos, como, por exemplo, o datalogger da Lascar Electronics EL-USB-2-LCD+, são usados muitas vezes para a medição de temperatura e humidade relativa do ar no interior dos equipamentos de refrigeração, limitando-se a adquirir os dados referentes a estas grandezas, que podem posteriormente ser analisados pelo utilizador a partir de um interface gráfico. Ora, o objetivo desta dissertação consiste no desenvolvimento de um dispositivo semelhante, mas com a função adicional de calcular o crescimento microbiano para diversas bactérias, sendo projetado um circuito equivalente aos dos modelos que se encontram no mercado, com uma alteração na programação do microcontrolador.

Para atribuir ao dispositivo a função desejada, foi necessário determinar a equação que permitisse obter o valor de unidades formadoras de colónias por grama, para cada bactéria, a partir dos valores de temperatura e humidade relativa, adquiridos pelo sensor presente no dispositivo. Para tal foi utilizado o modelo de Baranyi & Roberts (1994) e a ferramenta online ComBase Predictor, que permitiram estimar os coeficientes para cada uma das bactérias estudadas. Sem o desenvolvimento desta equação simplificada, e a obtenção dos coeficientes que a caracterizam, não seria possível tornar real o objetivo desta dissertação, isto é, um dispositivo, não só com a capacidade de medir a temperatura e a humidade relativa do ar num equipamento de refrigeração, mas também o aviso ao utilizador que um dos alimentos presentes no equipamento contém já um número de UFC/g que o torna impróprio para consumo com potencial prejuízo à saúde.

A determinação da fórmula que relaciona o declive máximo de crescimento com os fatores intrínsecos e extrínsecos, tornou possível entender e analisar como estes parâmetros influenciam o crescimento de cada bactéria. Para isso foram criados gráficos tridimensionais

que representam essa influência. A criação destes gráficos é um aspeto extremamente relevante nesta dissertação, uma vez que permite visualizar a influência de todos os parâmetros num só gráfico, algo que até ao momento não tinha sido devidamente explanado em publicações de cariz científico.

Todos os elementos referidos anteriormente tornaram possível a construção do dispositivo, que tem ainda uma grande margem de progressão, mas que já apresenta resultados positivos e admissíveis na monitorização da temperatura e humidade relativa e na determinação do crescimento das bactérias seleccionadas, sendo os interfaces gráficos criados de fácil utilização e grande versatilidade.

## **5.2. Considerações específicas**

Para o capítulo ‘Estado da Arte’, foi feita uma pesquisa sobre os sintomas provocados pela ingestão de cada uma das bactérias consideradas, assim como o pH e a atividade de água dos alimentos que viriam a ser analisados pelo dispositivo criado. No mesmo capítulo, foi também investigado qual o modelo mais utilizado para caracterizar a curva de crescimento bacteriano, concluindo que o modelo de Baranyi & Roberts (1994) é aquele que o descreve com maior detalhe e maior precisão.

No capítulo 3 - ‘Protótipo experimental’ - foram utilizadas as informações obtidas na secção anterior para determinar um modelo de crescimento que determinasse o número de unidades formadoras de colónias, de uma determinada bactéria, em função dos valores de temperatura, humidade relativa e atividade de água. Com coeficientes estimados através da ferramenta Combase, foi obtida uma equação capaz de representar a curva de crescimento pretendida. Uma grande vantagem na obtenção desta equação reside na construção do gráfico tridimensional que representa a relação entre os 4 parâmetros referidos - declive máximo de crescimento, temperatura, humidade relativa e atividade de água.

A montagem do dispositivo foi feita com base num microcontrolador PIC, programado para adquirir os valores de temperatura e humidade relativa do ar, através de um sensor indicado para este efeito, e calcular o logaritmo de unidades formadoras de colónias de bactérias por grama que estejam presentes nos alimentos previamente seleccionados. Para fazer esta seleção e visualizar os valores medidos pelo sensor, assim como os gráficos que representam o crescimento bacteriano nos produtos alimentares seleccionados, foi desenvolvido um interface gráfico na ferramenta GUIDE do Matlab.

### **5.3. Sugestões de trabalhos futuros**

Com o terminar da dissertação, foram verificados vários aspetos que podem ser melhorados no futuro. Relativamente à programação do dispositivo, tanto o programa criado para o microcontrolador PIC utilizado, como aquele que controla o interface gráfico, podem ser otimizados para minimizar o tempo de processamento.

Num futuro próximo, é pretendido melhorar o circuito do dispositivo ao acrescentar uma memória externa capaz de guardar um maior número de dados adquiridos, assim como um módulo RTC (Real Time Clock) que permite guardar a hora exata a que foi feita cada medição.

É também ambicionado criar, a partir de um software de modelagem 3D, o exterior para o dispositivo, de modo a tê-lo totalmente funcional e eventualmente torná-lo comercializável.

É desejado criar o dispositivo em 3 modelos diferentes, embora todos tenham o mesmo propósito e a mesma estrutura. O dispositivo criado com esta dissertação é considerado o modelo base que avisa o utilizador da deterioração alimentar apenas a partir de um LED, sendo necessário aceder ao interface gráfico para verificar qual dos alimentos provocou a ativação do LED. O segundo modelo é semelhante ao primeiro, com a adição de um display no dispositivo onde não só aparece o nome do produto alimentar no qual alguma bactéria atingiu a dose infetante, como também permite ao utilizador selecionar os alimentos a analisar. Para este modelo, o interface mantém-se, uma vez que é necessário visualizar os valores das medições, assim como as curvas de crescimento para cada bactéria. O terceiro modelo, apesar de ser utilizado com o mesmo propósito dos anteriores, tem uma grande diferença em relação ao primeiro e ao segundo, uma vez que não necessita de ligação por USB para comunicar com o interface. Neste dispositivo será incorporado um módulo rádio que, através de comunicação wireless, envia os valores de temperatura e humidade relativa adquiridos para um servidor online, onde serão analisados e associados aos diferentes produtos alimentares em estudo. Esta função não só permite que o dispositivo nunca tenha que ser retirado do equipamento de refrigeração para serem selecionados novos alimentos, como torna possível ao utilizador ver as medições e as curvas de crescimento bacteriano em tempo real.

A nível do estudo de bactérias, é suposto atualizar o dispositivo com mais alimentos e bactérias. Para testar se o crescimento de cada microrganismo se encontra em conformidade com a realidade, é pretendido solicitar o apoio de um laboratório que tenha capacidades de estudar biologicamente o desenvolvimento das bactérias em diferentes produtos alimentares, de modo a comparar esses resultados com aqueles calculados. Esta comparação irá permitir analisar erros e alterar os coeficientes de modo a melhorar o desempenho do dispositivo.

## Referências bibliográficas

Baranyi J., Roberts T.A., McClure P.J. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 43-59.

Baranyi J., Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.

Baranyi J. (2010). *Modelling and parameter estimation of bacterial growth with distributed lag time* (Unpublished doctoral thesis). University of Szeged, Hungary.

Chirife J., Vigo M.S., Gómez R.G., Favetto G.J. (1989). Water Activity and Chemical Composition of Mayonnaises. *Journal of Food Science*, 54(6), 1658-1659.

FAO. (2013). *Food Wastage Footprint: Impacts on Natural Resources*. Rome, Italy.

FDA. (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second Edition. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) of the Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, Silver Springs, USA.

Franzetti L., Scarpellini M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57(1), 39-47.

Gaspar P.D., Domingues C., Gonçalves L.C.C, Andrade L.P. (2009). Avaliação da qualidade e segurança alimentar pela previsão do crescimento microbiano em diferentes condições de conservação. Proceedings of V Congreso Ibérico y III Congreso Iberoamericano de Ciencias y Técnicas del Frío (CYTEF-2009), Castelló, Espanha.

Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), 419-431.

Gogou E., Derens E., Alvarez G., Taoukis P. (2014). Field test monitoring of the food cold chain in European markets. Proceeding of 3rd International Institute of Refrigeration International Conference on Sustainability and the Cold Chain (ICCC 2014), St Mary's University College, Twickenham, London.

Gompertz B.J. (1825). On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 115, 513-583.

Grijnspeerdt K., Vanrolleghem P.A. (1999). *Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. Food Microbiology*, 16, 593-605.

Masana, N.O., Baranyi, J. (2000). *Adding new factors to predictive models: the effect on the risk of extrapolation. Food Microbiology*, 17, 367-374.

Microchip. (2014). *PIC16(L)F1713/6, DS40001726B*

Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios (JO L 139 de 30.4.2004).

Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal (JO L 139 de 30.4.2004).

Widdel, F. (2010). *Theory and Measurement of Bacterial Growth. Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4, 2-11.

Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., Prescott, L. M. (2009). *Prescott's Principles of Microbiology*. Boston: McGraw-Hill Higher Education.

Winsor, P. (1932). *The Gompertz Curve as a growth curve. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 18(1), 1-8.

Whiting, R.C. (1995). *Microbial modeling in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 467-494.

WRAP. (2009). *Household Food and Drink Waste in the UK*. Banbury, England.

## Webgrafia

ASAE. (2007). *HACCP*. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). [Online]. Available:

<http://www.asae.pt/pagina.aspx?back=1&codigono=54105579AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA>

[Accessed: 30-Sep-2015].

Arrow Scientific. (2013). *Bacillus cereus*, [Online], Available:

[http://www.arrowscientific.com.au/index.php?option=com\\_content&view=article&id=40:bacillus-cereus&catid=25:microbiology&Itemid=40](http://www.arrowscientific.com.au/index.php?option=com_content&view=article&id=40:bacillus-cereus&catid=25:microbiology&Itemid=40) [Accessed: 30-Sep-2015].

Combase. (2015). *ComBase Predictor: Growth Model*, [Online], Available:

[https://browser.combase.cc/ComBase\\_Predictor.aspx?model=1](https://browser.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx?model=1) [Accessed: 30-Sep-2015].

CVO/Food Safety Knowledge Centre. (2015). *Water content and water activity: two factors that affect food safety*, [Online], Available: [http://www.gov.mb.ca/agriculture/food-safety/at-the-food-processor/water-content-water-activity.html#water\\_content](http://www.gov.mb.ca/agriculture/food-safety/at-the-food-processor/water-content-water-activity.html#water_content)

[Accessed: 30-Sep-2015].

Digikey. (2015). *Scheme-it*, [Online], Available: <http://www.digikey.com/schemeit/>

[Accessed: 30-Sep-2015].

European Commission. (2015). *Food Waste*, [Online], Available:

[http://ec.europa.eu/food/safety/food\\_waste/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/safety/food_waste/index_en.htm) [Accessed: 30-Sep-2015].

FAO. (2015). *Key facts on food loss and waste you should know!*, [Online], Available:

<http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en> [Accessed: 30-Sep-2015].

Food Tech Source. (2002). *Water Activity*, [Online], Available:

[http://www.foodtechsource.com/rcenter/tech\\_data/td\\_water.htm](http://www.foodtechsource.com/rcenter/tech_data/td_water.htm) [Accessed: 30-Sep-2015].

Science Encyclopedia. (2015). *Bacteria - Characteristics of Bacteria, Bacterial Growth, Physical and Chemical Requirements for Bacterial Growth, The Role Of Bacteria In Fermentation - Aerobic and anaerobic bacteria*, [Online], Available:

<http://science.jrank.org/pages/714/Bacteria.html> [Accessed: 30-Sep-2015].