



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

**ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO PREDITIVO  
MOLECULAR PARA DESCREVER O CRESCIMENTO DE *Leuconostoc  
mesenteroides* E *Weissella viridescens* EM CONDIÇÕES NÃO  
ISOTÉRMICAS**

Charles Kautzmann

Florianópolis

2019



CHARLES KAUTZMANN

**ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO PREDITIVO  
MOLECULAR PARA DESCREVER O CRESCIMENTO DE *Leuconostoc  
mesenteroides* E *Weissella viridescens* EM CONDIÇÕES NÃO  
ISOTÉRMICAS**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr. Gláucia M. Falcão de Aragão

Coorientadora: Me. Danielle de Sousa Severo

Florianópolis

2019

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

Kautzmann, Charles  
ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO PREDITIVO  
MOLECULAR PARA DESCREVER O CRESCIMENTO DE *Leuconostoc*  
*mesenteroides* E *Weissella viridescens* EM CONDIÇÕES NÃO  
ISOTÉRMICAS / Charles Kautzmann ; orientador, Glaucia Maria  
Falcão de Aragão, coorientador, Danielle de Sousa Severo,  
2019.  
49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico,  
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Microbiologia preditiva.  
3. Bactérias ácido-lácticas. 4. Crescimento não  
isotérmico. 5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa.  
I. Aragão, Glaucia Maria Falcão de. II. Severo, Danielle  
de Sousa. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Cleusa e Clóvis, meu irmão Cristian e minha amada Lê.

## RESUMO

Um dos grandes problemas encontrados na indústria de alimentos, em especial na indústria de produtos cárneos, é a perda relacionada ao crescimento de microrganismos deteriorantes. Um grupo de bactérias deteriorantes presente em produtos cárneos é o das bactérias ácido-láticas (BAL), sendo que os gêneros de BALs mais encontrados são *Weissella* e *Leuconostoc*. O desenvolvimento desses microrganismos está relacionado à forma com que o alimento é armazenado e transportado, em que os produtos acabam sendo submetidos a temperaturas acima da ideal para o seu armazenamento. Portanto, conhecer e prever o comportamento desses microrganismos em alimentos é de fundamental importância. Uma ferramenta bastante utilizada para estudar o comportamento microbiano é a microbiologia preditiva, que propõe modelos que podem descrever o comportamento microbiano em condições não isotérmicas. Esta ferramenta vem sendo associada com novas técnicas de identificação/quantificação microbiana, como é o caso dos métodos moleculares para predição do crescimento. Os métodos moleculares apresentam diversas vantagens por serem mais rápidos, específicos e sensíveis do que os métodos convencionais como o plaqueamento, mas devem ser devidamente testados e validados. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi comparar os métodos de quantificação microbiana Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Contagem Padrão em Placa (CPP), verificando, a partir de análises estatísticas, se o método da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa, pode ser utilizado de forma significativa para prever e descrever o comportamento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, em condição não isotérmicas. Ao utilizar o corante SYBR® *Green* para técnica de qPCR, testes de amplificação, como a curva de *melting*, foram realizados, e apresentaram bons resultados, indicando então uma reação específica. O método da qPCR, em comparação ao método de CPP, apresentou bons resultados na quantificação microbiana, sendo a comparação entre ambos métodos testada pela análise de Bland-Altman e confirmando a representatividade dos resultados obtidos. Com relação ao método de qPCR, o modelo de Baranyi foi utilizado para prever o crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em condições não isotérmicas. Os experimentos de validação do modelo mostraram que o modelo subestimou os dados experimentais para as duas bactérias estudadas, mas teve-se uma melhor predição para a BAL *L. mesenteroides*, apresentando bons índices estatísticos: RMSE de 0,605, R<sup>2</sup> de 0,942, Fator bias de 1,02 e Fator de exatidão de 1,894. Sugere-se trabalhos futuros com a utilização de outros modelos para a predição e outros modelos secundários para tentar melhor representar o crescimento em condições variadas de temperatura. O método molecular de quantificação mostrou-se viável na quantificação de BAL em condições não-isotérmicas, sendo mais um passo ao avanço das novas tecnologias de quantificação microbiana.

**Palavras-chave:** Microbiologia preditiva. Bactérias ácido-láticas. Crescimento não isotérmico. Reação em cadeia da polimerase quantitativa.

## ABSTRACT

One of the biggest problems that exist in the food industry, especially in the meat products industry, is the loss related to the growth of deteriorating microorganisms. A group of deteriorating bacteria present in meat products is the acid-lactic bacteria (BAL), and the most common BAL gender are *Weissella* and *Leuconostoc*. The development of these microorganisms is related to the way that food is stored and transported, in which the products end up being subjected to temperatures above the ideal for their storage. Therefore, knowing and predicting the behavior of these microorganisms in food is very important. A tool widely used to study microbial behavior is predictive microbiology, which proposes models that can describe microbial behavior in non-isothermal conditions. This tool has been associated with new microbial identification / quantification techniques, such as molecular methods for growth prediction. Molecular methods have several advantages because they are faster, specific and sensitive than conventional methods such as plating, but they must be properly tested and validated. Thus, the objective of this study was to compare the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and standard plate count (CPP) microbial quantification methods, verifying, from statistical analyzes, whether the Quantitative Polymerase Chain Reaction, can be used to predict and describe the behavior of *L. mesenteroides* and *W. viridescens*, in non-isothermal conditions. When it was used the SYBR® Green dye for qPCR technique, amplification tests, such as the melting curve, were performed, and presented good results, indicating a specific reaction. The qPCR method, compared to the CPP method, showed good results in the microbial quantification, and the comparison between both methods tested by the Bland-Altman analysis confirmed the representativeness of the results that were obtained. Regarding the qPCR method, the Baranyi model was used to predict the growth of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* under non-isothermal conditions. The validation experiments of the model, showed that the model underestimated the experimental data for the two bacteria studied, but a better prediction was obtained for BAL *L. mesenteroides*, presenting good statistical indices: RMSE of 0.605, R<sup>2</sup> of 0.942, Factor bias of 1.02 and accuracy factor of 1.894. Future studies are suggested using other models for prediction and other secondary models to better represent growth under varying temperature conditions. The molecular quantification method proved to be viable in the quantification of BAL in non-isothermal conditions, being a further step in the advancement of new microbial quantification technologies.

**Keywords:** Predictive Microbiology. Acid-lactic bacteria. Non-isothermal growth. Quantitative polymerase chain reaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de melting para <i>L. mesenteroides</i> (A) e <i>W. viridescens</i> (B).....	25
Figura 2: Análise de regressão linear do método CPP e qPCR para <i>L. mesenteroides</i> (A) e <i>W. viridescens</i> (B). .....	28
Figura 3: Avaliação de concordância entre os métodos de CPP e qPCR por Bland-Altman na quantificação de <i>L. mesenteroides</i> (A) e <i>W. viridescens</i> (B).....	30
Figura 4: Curvas da predição do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> (A) e <i>W. viridescens</i> (B) em condições não-isotérmicas, obtidas pelos métodos de qPCR e CPP. ....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para reações de qPCR.....	19
Tabela 2: Valores médios para o teste de especificidade para os pares de iniciadores SCAR utilizando DNA extraído de <i>L. mesenteroides</i> (controle positivo), outras espécies bacterianas e água milli-Q (controles negativos). .....	23
Tabela 3: Teste de especificidade para os pares de iniciadores recN utilizando DNA extraído de <i>W. viridescens</i> (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos). .....	24
Tabela 4: Comparação CPP e qPCR obtidos pelos métodos de CPP e qPCR. ....	27
Tabela 5: Valores de Ct e Tm obtidos por qPCR para <i>L. mesenteroides</i> e <i>W. viridescens</i> . .....	32
Tabela 6: Índices estatísticos para predição do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> e <i>W. viridescens</i> sob condições não isotérmicas. ....	37

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1	OBJETIVOS.....	8
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>10</b>
2.1	BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS .....	10
<b>2.1.1</b>	<i>Weissella viridescens</i> .....	<b>10</b>
<b>2.1.2</b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	<b>11</b>
2.2	MICROBIOLOGIA PREDITIVA .....	12
<b>2.2.1</b>	<b>Modelos preditivos</b> .....	<b>13</b>
2.2.1.1	Modelos não isotérmicos.....	14
2.3	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA.....	14
<b>2.3.1</b>	<b>Método de contagem em placas</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Método de qPCR</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1	EXTRAÇÃO DO DNA.....	18
3.2	ENSAIOS DE qPCR .....	18
3.3	MODELO NÃO ISOTÉRMICO.....	20
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
4.1	VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS .....	23
<b>4.1.1</b>	<b>Especificidade dos iniciadores</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Curva de <i>melting</i></b> .....	<b>24</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Curva padrão</b> .....	<b>26</b>
4.2	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS .....	26
4.3	MODELAGEM DAS CURVAS DE CRESCIMENTO .....	31

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Uma vez que a variação de temperatura altera a dinâmica de crescimento microbiano durante o armazenamento de alimentos, o uso de modelos matemáticos que levam estas variações em consideração podem ser muito úteis na previsão da vida útil de alimentos (LONGHI *et al.*, 2013). Silva *et al.* (2017) descreveram que, mesmo em períodos curtos sob temperaturas acima da temperatura de refrigeração, os produtos cárneos são deteriorados e que o prazo de validade de tais produtos depende do número e tipo de microrganismos (principalmente bactérias) inicialmente presentes, além de seu crescimento subsequente.

O grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) é o de maior evidência na deterioração de carnes refrigeradas e embaladas a vácuo, destacando as espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella viridescens*. Por conseguinte, é importante conhecer a capacidade de crescimento deste microrganismo no alimento, durante o processamento, conservação, armazenamento e distribuição, e ainda observar seu crescimento em condições com temperaturas variadas, podendo simular uma falha na cadeia do frio e garantir a segurança ao produto final (FU; LABUZA, 1992; FERREIRA, 2004).

A modelagem preditiva pode ajudar na análise preliminar de perigos, identificação e estabelecimento de pontos críticos de controle, ou ainda em ações corretivas a serem tomadas (BROUGHALL e BROWN, 1984). Os modelos matemáticos para avaliar o crescimento microbiano podem ser classificados em: modelos primários, que representam o crescimento dos microrganismos ao longo do tempo para um conjunto de condições ambientais; modelos secundários, que descrevem a dependência de um ou mais parâmetros do modelo primário com um fator ambiental (como a temperatura); Modelos dinâmicos, como a modelagem não isotérmica, para prever a influência das condições ambientais no crescimento microbiano (LONGHI *et al.*, 2013; WHITING e BUCHANAN, 1993).

O método de contagem padrão em placas (CPP) é uma técnica muito utilizada na determinação da concentração de uma população bacteriana. No entanto, esse método apresenta algumas desvantagens, por ser uma técnica demorada, e que não distingue colônias morfológicamente semelhantes. Segundo Sant'anna (2014), as principais técnicas para identificação de BAL fundamentadas em métodos moleculares estão relacionadas ao sequenciamento e/ou amplificação de sequências altamente conservadoras nos genes, como é o caso do método da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR), que é utilizado para detectar, identificar e quantificar microrganismos patogênicos, deteriorantes ou até

mesmo populações benéficas (LE DRÉAN *et al.*, 2010; MALORNY *et al.*, 2008; MASCO *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de procedimentos de qPCR que permitam a detecção e quantificação específica de BAL, como por exemplo, a identificação desses microrganismos em cultura mista (microbiota natural), confere uma série de vantagens em relação a outros métodos genotípicos para identificar essa espécie (como a CPP), como menor tempo de teste e ainda uma estimativa mais sensível e específica do número de microrganismos presentes em uma matriz alimentar (MARTÍNEZ *et al.*, 2011). A tecnologia qPCR baseia-se na quantificação de um *amplicon* alvo, onde normalmente, segundo Hanna *et al* (2005), é marcado com um corante intercalante de DNA fluorescente, como o SYBR *Green*, relacionando a quantidade do DNA sintetizado com um sinal de fluorescência. Desta maneira, o método demonstra ser uma ferramenta específica, sensível, rentável e rápida para detectar e quantificar BAL.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Estabelecer e validar um modelo preditivo molecular, utilizando o método de qPCR baseado em SYBR® *Green*, para descrever o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella viridescens*, em condições não isotérmicas de cultivo.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Extrair o DNA das bactérias *L. mesenteroides* e *W. viridescens* utilizando kit de extração comercial;
- Elaborar as curvas de crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em meio de cultivo pelo método de qPCR baseado em SYBR *Green*;
- Comparar as técnicas de CPP e qPCR quanto a quantificação de *L. mesenteroides* e *W. viridescens*.

- Utilizar os dados de crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* obtidos por CPP e qPCR para validar o modelo não isotérmico pré-estabelecido no grupo de pesquisa.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Segundo Gram *et al.* (2002), cada alimento contém uma microbiota específica em sua composição, que é composta de microrganismos que contribuem para a deterioração e microrganismos que apenas se desenvolvem, mas não influenciam em mudanças no alimento. O crescimento de microrganismos em alimentos depende da matéria-prima, efeitos das condições de processamento, preservação e armazenamento do mesmo, Diez *et al.* (2009). Os microrganismos constituintes do grupo das bactérias ácido-lácticas (BAL) apresentam características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e bioquímicas comuns, são Gram-positivas, não formadoras de esporos, microaerófilas e anaeróbias facultativas (CARR *et al.* 2002).

As BAL têm um papel ativo na deterioração de produtos cárneos, a qual é observado principalmente em produtos refrigerados e embalados a vácuo ou em atmosfera modificada Deiz *et al.* (2008) indica que o número inicial de BAL no produto, está diretamente relacionado à sua vida útil, devido à deterioração sensorial, identificada pela presença de limo, odor forte e sabor amargo, que é relacionado à produção de ácido láctico, que provoca a redução do pH.

#### 2.1.1 *Weissella viridescens*

A morfologia do gênero *Weissella* é facilmente confundida com a de outros representantes de BAL, em particular com as espécies de *Leuconostoc* e do gênero *Lactobacilos*. *Weissellas spp.* são geralmente bastonetes irregulares gram-positivos com extremidades arredondadas. Estes microrganismos são opcionalmente anaeróbicos e crescem rapidamente sobe incubação microaerofílica, não são esporulados e em geral apresentam oxidase e catalase negativas. (NIVEN e EVANS 1957; COLLINS *et al.* 1993). Importante salientar também que, este gênero apresenta-se em ambientes muito diversos.

As BAL da espécie *W. viridescens* são conhecidas por causar deterioração em produtos cárneos embalados a vácuo, mesmo em condições de refrigeração (KALSCHNE *et al.* 2015; DIEZ, 2009a). Santos *et al.* (2005) demonstram que, quando salsicha de sangue é embalada a vácuo ou em atmosfera modificada, a microbiota deteriorante típica é, predominantemente de BAL, como a espécie *W. viridescens*, as quais também já foram

associadas a deterioração de diferentes produtos cárneos, como lombo de porco (BLICKSTAD e MOLIN, 1983), salsichas (BORCH *et al.*, 1996) e outros produtos de carne cozida (HAN *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2009). A espécie também é associada à produção de álcoois, cetonas (DIEZ *et al.*, 2009), e esverdeamento de derivados cárneos, devido à produção de peróxido de hidrogênio (NIVEN E EVANS, 1957; HEMMES *et al.*, 1991).

Em estudo reportado por Diez *et al.* (2008), a espécie *W. viridescens* apresentou baixa sensibilidade ao tratamento com alta pressão, onde sua viabilidade não foi afetada por pressões de até 300 MPa, Hugas *et al.* (2002) indicam que isto ocorre devido as dificuldades na transferência de pressão para a amostra, e o efeito baroprotetor de certos constituintes de alimentos ricos em proteínas. No estudo reportado por Santos *et al.* (2005), amostras de salsichas de sangue mesmo sendo embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C, ainda apresentaram rápido crescimento de BAL, destacando que nestas condições, o crescimento foi predominante da espécie *L. mesenteroides*, porém quando o produto foi pasteurizado após a embalagem, o gênero *W. viridescens* foi quem apresentou maior crescimento. Estas evidências reforçam a dificuldade do controle de crescimento da espécie *W. viridescens* e, conseqüentemente, a conservação de alimentos suscetíveis a este microrganismo.

### **2.1.2 *Leuconostoc mesenteroides***

As cepas de *leuconostoc* são cocos não móveis e não formadores de esporos, geralmente presentes como pares ou cadeias curtas que pertencem ao grupo das bactérias Gram-positivas, são heterofermentativas, produtoras de CO<sub>2</sub>, etanol e acetato (HEMME e FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004). Estas bactérias anaeróbias facultativas abrigam características mesófilas, crescimento a 30 °C, porém são favorecidas em temperaturas de refrigeração. A maioria das cepas apresenta crescimento na faixa de 10 °C até 4 °C (HAMASAKI *et al.* 2003), nesse caso o método de conservação pelo frio uma baixa eficiência se aplicado isoladamente.

Para detectar *L. mesenteroides* em alimentos é necessário o isolamento de colônias em meio de *Man, Rugosa e Sharpe* (MRS), podendo ser modificado ou não por omissão de citrato e extrato de carne, subseqüentemente, uma série de isolados devem ser identificados por meio de testes bioquímicos, morfológicos e fisiológicos. As espécies do gênero *Leuconostoc* apresentam muitas características fenotípicas e têm necessidades de crescimento complexas, dificultando assim a sua identificação por testes fenotípicos (ELIZAQUÍVEL;

CHENOLL; AZNAR, 2008).

*L. mesenteroides* já foi encontrada em cerveja (POVEDA, 2017), tilápia do Nilo (BILAL *et al.*, 2018) e produtos fermentados como, vegetais, produtos lácteos e bebidas (O'SULLIVAN *et al.*, 2002). Porém é frequentemente isolado em produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, contribuindo para o processo de deterioração destes produtos, causando a diminuição do pH e provocando o aparecimento de sabores estranhos (ZHANG; HOLLEY, 1999).

Em geral *L. mesenteroides* cresce mais rapidamente que *W. viridescens*, devido ao seu metabolismo energeticamente mais eficiente. O crescimento dessas bactérias está associado ao aparecimento de certos compostos voláteis, como aldeídos e ácidos (DIEZ *et al.*, 2009), apresentando assim a produção de exsudatos lácteos, tão viscosos como limo, e conseqüentemente odor azedo. Vermeiren *et al.* (2005) também confirmaram um comportamento menos acidificante de *W. viridescens* em oposição a *L. mesenteroides* em amostras de presunto cozido inoculado. Santos *et al.* (2005) relataram que o dióxido de carbono em concentrações inferiores a 30%, retarda o crescimento de BAL, pertencente às espécies *W. viridescens*, *L. mesenteroides* e *L. carnosum*, porém quando o produto é embalado a vácuo, a proporção de *Leuconostoc spp.* aumenta no produto.

## 2.2 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva abrange áreas como matemática, engenharia, química e microbiologia (ZWIETERING *et al.*, 1990; ZWIETERING *et al.*, 1993; WHITING e BUCHANAN, 1994; PELEG, 1997; SCHAFFNER e LABUZA, 1997) para descrever o comportamento de microrganismos e, assim, estudar e prever a vida útil dos alimentos. O principal objetivo é utilizar modelos matemáticos para descrever a evolução de microrganismos sobre a influência de fatores ambientais intrínsecos (pH e atividade de água) e fatores extrínsecos, como a temperatura e atmosfera gasosa (ZURERA-COSANO *et al.*, 2006).

Comumente, o crescimento microbiano pode ser descrito por uma curva sigmoideal com três fases: uma fase de latência, onde as células microbianas adaptam-se ao novo ambiente, seguido por uma fase em que as células se multiplicam de forma exponencial e, finalmente, uma fase estacionária durante a qual a população máxima é atingida (LEBERT, 2006).

Uma abordagem é modelar a velocidade de crescimento de um microrganismo e usá-lo para fazer previsões baseadas no crescimento exponencial dessa população microbiana. Outra abordagem é ajustar uma função sigmóide ou curva a um dado de crescimento da população microbiana, e depois modelar os efeitos de vários fatores ambientais. Em ambas as abordagens os modelos são construídos por meio da avaliação de dados recolhidos sobre o aumento na biomassa microbiana (MCDONALD e SUN, 1999).

### 2.2.1 Modelos preditivos

Um modelo microbiológico preditivo para alimentos é uma matemática que descreve o crescimento, sobrevivência, inativação ou processo bioquímico de um microrganismo de origem alimentícia (MCDONALD E SUN, 1999). Os diversos modelos que podemos encontrar, hoje são classificados em um sistema proposto por Whiting e Buchanan (1993), o qual agrupa os diferentes tipos de modelos em: Modelos primário, secundário e terciário, onde a divisão é feita dependendo da característica de cada modelo.

Segundo McDonald e Sun (1999), os modelos primários descrevem a mudança do número bacteriano com o tempo sob condições ambientais e particulares de cada microrganismo. Se uma curva de crescimento bacteriano é monitorada registrando-se como a contagem total de viáveis muda com o tempo, os dados coletados podem ser plotados usando um modelo primário. O modelo primário mais utilizado na literatura é modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994). De acordo com Menezes *et al.* (2018) e Slongo *et al.* (2009), o modelo de Baranyi e Roberts é capaz de descrever de forma adequada o crescimento microbiano em presunto.

Os modelos secundários descrevem a resposta de um ou mais parâmetros de um modelo primário (mudanças nas condições do meio de cultivo ou ambientais). A escolha do modelo depende em grande parte do número de variáveis e variedades de microrganismos envolvidos. O modelo de raiz quadrada (RATKOWSKY *et al.*, 1982) é utilizado para descrever a influência da temperatura na taxa de crescimento específico máximo, onde o logaritmo natural da população máxima é descrito por uma média aritmética dos valores obtidos isotermicamente. Menezes *et al.* (2018), utiliza o modelo da Raiz Quadrada para previsões em amostras de presunto fatiado, verifica valores de  $R^2$  próximos a um e RMSE próximos a zero, correspondendo assim á bons resultados com este modelo.

Por fim têm-se os modelos terciários, os quais basicamente levam a modelagem à sua forma final, são aplicações de um ou mais modelos primários e secundários, incorporados em um pacote de software de computador (MCDONALD e SUN, 1999).

#### 2.2.1.1 Modelos não isotérmicos

A estabilidade microbiana dos alimentos é afetada por vários fatores, como temperatura, pH e atividade de água, porém alguns autores observaram uma maior influência da temperatura na cinética do crescimento microbiano, em oposição a estes outros fatores (Devlieghere *et al.*, 1998; Giannuzzi *et al.*, 1998). A temperatura dos alimentos é também um fator que geralmente variar muito até a chegada ao consumidor, sendo principalmente observado essa variação no transporte e varejo (LONGHI *et al.*, 2013). Portanto, para realizar a modelagem matemática do crescimento microbiano, é necessário o desenvolvimento de modelos, que podem descrever condições de variação de temperatura, podendo simular estes tipos de situações de falha na cadeia do frio (SILVA *et al.*, 2017; GOUGOULI e KOUTSOUMANIS, 2010; ROSS e MCMEEKIN, 1999).

Para a modelagem do crescimento microbiano em condições ambientais variáveis, os modelos utilizados apresentam equações diferenciais de primeira ordem, dos quais os parâmetros destas equações tornam-se funções das variações ambientais, dadas por modelos secundários adequados (LONGHI, 2012). Um dos modelos mais utilizados para descrever o crescimento em condições não isotérmicas, é o modelo de Baranyi e Roberts na forma diferencial. Segundo Longhi *et al.* (2013), dentre os modelos matemáticos descritos para prever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas, destaca-se ainda, o modelo de Gompertz modificado por Zwietering *et al.* (1990).

Os modelos não isotérmicos já vem sendo utilizados para predição do crescimento de BAL há algum tempo, Dalcanton *et al.* (2013) modelaram o crescimento de *Lactobacillus plantarum* em carne suína, Silva *et al.* (2017) validaram um modelo preditivo para prever o crescimento de *W. viridescens* em presunto, e recentemente, Severo (2018) estabeleceu um modelo para o crescimento de *L. mesenteroides* em meio MRS.

### 2.3 METODOS DE QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA

A quantificação da concentração celular em um meio de cultura é essencial para a determinação da cinética e estequiometria do crescimento microbiano, além é claro da vida

útil dos alimentos. A concentração de BAL de  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias por grama ( $7 \log \text{ UFC/g}$ ) é considerada como critério para determinar a vida útil de presunto e outros produtos de carne (MENEZES *et al.*, 2018 e SLONGO *et al.*, 2009).

Devido às limitações conhecidas dos métodos microbiológicos convencionais, como a necessidade de enriquecimento seletivo, longo tempo para obtenção de resultados e baixa resolução taxonômica, se observa nas últimas décadas, que as pesquisas na área da ciência dos alimentos, vão além das metodologias convencionais, avançando para as ferramentas moleculares, que têm sido bem estabelecidas nos ramos da medicina, farmacologia e biotecnologia (MOCO *et al.*, 2006 e DIEZ, 2008).

Segundo Garrido-Maestu *et al.* (2017), os métodos moleculares, como aqueles baseados na amplificação do DNA, têm a capacidade de superar algumas das limitações das técnicas baseadas na cultura, onde dentre essas metodologias, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (qPCR) têm sido amplamente aplicadas para fins de detecção de patógenos, BAL entre outros tipos de microrganismos.

### **2.3.1 Método de contagem em placas**

Entre os métodos convencionais empregados, se destacam os métodos turbidimétricos (densidade óptica) e a contagem padrão em placa (CPP), sendo esta última a técnica mais utilizada na determinação da concentração de uma população bacteriana. A vantagem desse método em relação ao método da densidade óptica (DO), e alguns métodos moleculares, é sua capacidade de quantificar apenas células viáveis, no entanto possui algumas desvantagens, além de ser uma técnica demorada, tendo em vista que o tempo de incubação no geral é entre 24 e 48 h, para o aparecimento das colônias viáveis em placas (inviável para análises em produtos alimentícios com vida útil curta), também é uma técnica que não distingue colônias morfolologicamente semelhantes (SEVERO, 2018).

Camargo (2015) mostra que a identificação e quantificação de BAL, presentes na microbiota natural de alimentos (cultura mista), pela utilização de métodos convencionais como a contagem em placas não é possível devido ao fato dessas apresentarem a mesma morfologia, dando resultados idênticos frente a estas análises. Porém, com o melhoramento nos métodos moleculares, novas técnicas surgiram para aumentar e potencializar a identificação de bactérias muito semelhantes (SANTOS, 2012).

### 2.3.2 Método de qPCR

A descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por Mullis Kary em 1984 é considerada como uma revolução na ciência, permitiu o posterior desenvolvimento da PCR quantitativa (qPCR) que é a detecção e expressão da análise de gene(s), em tempo real (DEEPAK *et al.*, 2007).

Martínez *et al.* (2011) destacam que entre os métodos independentes de cultura, o uso de técnicas de qPCR para detectar bactérias deteriorantes em produtos alimentícios, está se tornando cada vez mais popular. O uso desta técnicas resulta em uma série de vantagens em relação aos métodos tradicionais baseados em isolamento e caracterização. O qPCR é um método versátil, rápido, sensível, específico e preciso, que permite a detecção e quantificação de microrganismos em matrizes complexas, como em alimentos. Capaz de detectar populações sub-dominantes na ausência de um meio seletivo e na presença de outras populações dominantes (POSTOLLEC *et al.*, 2011 ).

O qPCR tem sido utilizado por vários autores para detectar e quantificar BAL em nível de gênero ou espécie, como *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, em várias matrizes alimentares (ACHILLEOS e BERTHIER, 2013; FALENTIN *et al.*, 2010; JUNG *et al.*, 2010).

Kubista *et al.* (2006), explica que a qPCR consiste em ciclos consecutivos de reação, os quais são divididos em três fases: desnaturação, anelamento e extensão, os quais dependem da variação de temperatura durante a análise. Na primeira fase, ocorre a desnaturação da dupla hélice de DNA por aquecimento (entre 94 °C e 96 °C), originando duas fitas simples. Na fase de anelamento, a temperatura é reduzida para que os iniciadores (sequência curta de oligonucleotídeos) se anelem às fitas simples de DNA, a temperatura de anelamento depende da sequência dos iniciadores e da força iônica da solução. Enquanto na fase de extensão, a temperatura é elevada (entre 72 °C e 76 °C) para que a enzima DNA polimerase tenha sua atividade máxima, permitindo a extensão dos iniciadores e a formação de novas fitas de DNA.

A detecção da amplificação da qPCR é baseada no uso de corantes intercalantes (SYBR® *Green*) que se ligam à dupla fita de DNA ou com o uso de sondas de hidrólises específicas (TaqMan®) para uma região da molécula que está sendo amplificada, por meio da absorção e emissão de luz em um comprimento de onda específico (PELT-VERKUIL *et al.*, 2008). Dentre estas técnicas, o sistema SYBR® *Green* é um dos mais utilizados, pois ele

apresenta vantagens como: Baixo custo, facilidade na utilização e alta sensibilidade de detecção. Em contrapartida, esse sistema apresenta como principal desvantagem a capacidade de gerar fluorescência na presença de qualquer dupla fita de DNA, sendo necessários testes adicionais, como a análise da curva de *melting* para confirmar a amplificação de um fragmento específico de acordo com o seu tamanho (BUSTIN, 2000 e PAUDEL *et al.*, 2011).

Os produtos de reação são analisados em um estágio inicial do processo de amplificação, quando a reação ainda está na fase exponencial, onde se prevê a maior eficiência, ou seja, é nesta fase que a relação entre a quantidade de produto e do input de DNA é, provavelmente, mais consistente, permitindo uma quantificação mais precisa do que a do final da reação (HEID *et al.*, 1996; OLIVEIRA, 2009 e STRACHAN e READ, 2013). Kubista *et al.* (2006) e Bustin (2000) revelam que existe um ponto na reação onde o nível de fluorescência atinge o limiar da fase exponencial, esse ponto corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável, isto é, que cruze o limiar de detecção, definido como *cycle threshold* (Ct).

Posteriormente a quantificação do número exato de moléculas (número de cópias de DNA) é feita a partir de uma curva padrão, obtida após análises em amostras de concentração conhecida. Para tal, os valores de Ct são projetados num gráfico de Ct versus o logaritmo da concentração de DNA, a qual já é conhecida (PELT-VERKUIL *et al.*, 2008).

Postollec *et al.*, (2011) explicam que um dos fatores mais importantes para garantir a reprodutibilidade das técnicas de qPCR e, portanto, preservar seu significado biológico, é a extração de DNA. Porém, mesmo que a extração de DNA tenha sido ótima, qualquer componente das soluções de extração de DNA ou meio de cultura podem inibir as reações de PCR. Estes componentes podem influenciar a eficácia, diminuir o limite de detecção ou aumentar o número de falsos negativos, em comparação com os resultados obtidos usando DNA puro. No entanto, Schrader *et al.* (2012) destacam que a linearidade observada na curva padrão indica a ausência de inibição nas reações de qPCR, garantindo a confiabilidade dos resultados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste estudo foram retiradas em cada ponto experimental das curvas de crescimento através de trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório Integrado de Engenharia Biológica – LiEB. As mesmas foram acondicionadas à - 24 °C em microtubos estéreis, livres de DNases/RNases para posterior extração de DNA bacteriano.

As cepas utilizadas neste trabalho foram *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (ATCC ® 8293 <sup>TM</sup>) e *Weissella viridescens* (CCT 5843 ATCC 12706). O perfil de temperatura estudado para *L. mesenteroides* foi avaliado nas seguintes condições: 8 °C durante 33,0 h, 14 °C durante 63,0 h e 8 °C durante 54,0 h (Esta variação busca representar uma falha no processamento de alimentos, onde uma temperatura acima da faixa de refrigeração é alcançada pelo produto durante o processo de armazenamento ou transporte, e posteriormente retorna à condição de refrigeração antes submetida). Para *W. viridescens* a variação do perfil de temperatura foi avaliada em variação decrescente e posterior variação crescente, sendo 12°C por 16,73 h; 8°C por 34,15 h e 4 °C por 104,64 h; 8°C por 34,15 h e por fim 12 °C por 58,33 h. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e realizados em duas BOD programadas nas temperaturas estudadas, e os dados foram gravados em datalogger (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha) em intervalos de tempo pré-determinados a cada 15 min.

#### 3.1 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* foi realizada utilizando kit de isolamento de DNA microbiano UltraClean<sup>TM</sup> da MOBIO Laboratories (Carlsbad, USA), seguindo todas as instruções do fabricante.

Para conservação do material genético previamente extraído, o mesmo foi congelado em freezer a -24 °C até a realização dos ensaios de qPCR.

#### 3.2 ENSAIOS DE QPCR

A preparação dos ensaios baseia-se na adição dos reagentes em microtubos onde se dará a realização do ensaio no equipamento. Os reagentes utilizados para a reação de

*L. mesenteroides* são: 10 µL de 2 × Rotor-Gene SYBR *Green* Master Mix (uma solução contendo o tampão, as bases nitrogenadas e a enzima DNA polimerase), 300 nM dos iniciadores (Tabela 1), 5 µL do DNA microbiano extraído, e por fim ajustado o volume de 20 µL com água livre de RNase. As concentrações utilizadas já foram testadas quanto sua eficiência por Severo (2018). Para o ensaio com *W. viridescens* as proporções foram de: 10 µL de 2 × Rotor-Gene SYBR *Green* Master Mix, 300 nM dos iniciadores (Tabela 1), 2 µL do DNA microbiano extraído, e por fim ajustado o volume de 20 µL com água livre de RNase. Ressaltando também que estas concentrações já foram estudadas e testadas por Martins (2019, no prelo) para obtenção de melhores resultados, assim como os iniciadores também foram previamente testados quanto sua especificidade.

Importante ressaltar que estas reações foram realizadas em 3 repetições afim de se obter resultados mais confiáveis, além do fato de sempre termos um controle negativo contendo água livre de DNases (substituindo o DNA extraído) para cada ensaio realizado.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para reações de qPCR.

Cepas	Iniciador <sup>1</sup>	Sequência (5´- 3´)	Tm <sup>2</sup> (°C)	Referência
			82	
<i>L. mesenteroides</i>	SCAR-LEU-F	GTGGTCATGGGTCTTAGC		(PETRI <i>et al.</i> , 2013)
	SCAR-LEU-R	GGATCAAGACTAGCCAATG		
<i>W. viridescens</i>	RecN-F	CGCAAACACAACAAGCCTAT	81	(GÓMEZ-ROJO <i>et al.</i> , 2015)
	RecN-R	TGTTGAGCAAGTTCCAAAGC		

<sup>1</sup>O iniciador tem o nome do gene alvo, e **F** e **R** no final do nome do iniciador indicam as orientações *Forward* e *Reverse*, respectivamente. <sup>2</sup>Temperatura de *melting* (Tm).

**Fonte:** Adaptado de Severo, 2018.

Os iniciadores escolhidos para replicação do DNA alvo devem ser específicos ao microrganismo que se pretende quantificar, ou seja, não devem produzir qualquer replicação de DNA microbiano diferente daquele que se está estudando. Para a verificação desta condição, ensaios de qPCR foram realizados com os iniciadores (*primers*) utilizados nas reações, porém junto aos outros componentes da reação, agora não é colocado o DNA do microrganismo estudado, mas sim o DNA de outras espécies de microrganismos, de forma que o *primer* não deve dar condições de prosseguimento a replicação e assim, prova-se que o

mesmo irá garantir que o DNA gerado/replicado em uma reação de qPCR, seja somente do microrganismo desejado.

O equipamento utilizado para as reações de qPCR foi o termociclador *Real Time Rotor-Gene Q*<sup>®</sup> (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland), localizado no Núcleo de Microbiologia de Alimentos do Laboratório de Ciências e Tecnologia de Alimentos - CCA/UFSC, utilizando o kit Rotor-Gene SYBR<sup>®</sup> *Green PCR* (Qiagen, Hilden, Germany). O sinal de fluorescência foi analisado no primeiro canal do SYBR<sup>®</sup> *Green I*, com excitação em 470 nm e detector em 510 nm; Com a leitura florescente observada ao final de cada etapa de extensão.

As condições de ciclagem para quantificação de *L. mesenteródes* é descrita por Sambrook (2012), sendo assim utilizados as seguintes configurações: 5 min a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 10 s a 60°C, 30 s 72 °C, e por fim um passo de extensão final durante 5 min a 75 °C. Já para a *W. viridescens* a ciclagem teve as seguintes condições: 5 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 64 °C, 30 s a 72 °C e ao final realizou-se uma extensão por 10 min a 72 °C.

Ao final de cada ensaio, procedeu-se a realização da análise da curva de *melting*, onde pode-se observar a especificidade das amplificações por estar utilizando o método SYBR<sup>®</sup> *Green*. Esta análise é realizada com a construção do gráfico da primeira derivada da fluorescência pela temperatura, durante o aquecimento realizado nas amostras de 65 °C até 95 °C (0,5 °C/s). O equipamento com o comando ativado automaticamente realiza o procedimento e fornece os dados a serem analisados.

### 3.3 MODELO NÃO ISOTÉRMICO

O estabelecimento do modelo preditivo não isotérmico foi realizado a partir de um dos modelos mais utilizados na literatura, o modelo de Baranyi e Roberts (1994), apresentado nas Equações 1 e 2, o qual já foi testado no grupo de pesquisa e apresentou bons resultados pra predição de BAL.

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left[ \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] [1 - e^{(y(t)-y_{m\acute{a}x})}] \quad (1)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \quad (2)$$

Em que  $y(t)$  é o logaritmo natural da contagem microbiana no tempo  $t$ ;  $Q(t)$  é a função do estado fisiológico das células; e os parâmetros  $\mu_{\text{máx}}$  e  $y_{\text{máx}}$  são funções da temperatura, descritos pelo modelo secundário.

Utilizando as condições iniciais descritas nas equações 3 e 4 juntamente com o software MATLAB® R2012a versão 7.14 (MathWorks, Natick, USA), com utilização do método de *Runge-Kutta* (função *ode23*, como descrito por Longhi (2012), foi possível a obtenção do modelo preditivo.

$$Q(0) = \ln(e^{(h_0)} - 1) \quad (3)$$

$$y(0) = y_0 \quad (4)$$

O valor de  $y_0$  representa o logaritmo natural da contagem bacteriana inicial, e  $Q_0$  é o valor que se relaciona com o parâmetro  $h_0$ , condizente ao estado fisiológico inicial das células.

### 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A capacidade preditiva do modelo e confiabilidade dos dados obtidos é avaliada por índices estatísticos, erro quadrático médio (RMSE), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{aj}$ ) (SOPER *et al.*, 1916), fator exatidão e fator bias, representados nas equações 6, 7, 8 e 9, respectivamente, para avaliação dos resultados.

$$R^2_{aj} = 1 - \left[ \frac{n-1}{n-x+1} \right] \left\{ \frac{[\sum_{i=1}^n (pd_i - \overline{pd})(ob_i - \overline{ob})]^2}{\sum_{i=1}^n (pd_i - \overline{pd})^2 \sum_{i=1}^n (ob_i - \overline{ob})^2} \right\} \quad (6)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (ob_i - pd_i)^2}{n-p}} \quad (7)$$

$$Fator\ exatidão = 10^{\left( \frac{\sum_{i=1}^n |\log(pd_i/ob_i)|}{n} \right)} \quad (8)$$

$$Fator\ bias = 10^{\left( \frac{\sum_{i=1}^n \log(pd_i/ob_i)}{n} \right)} \quad (9)$$

Em que  $n$  é o número de dados experimentais,  $x$  é a variação dos mesmos,  $p$  é o número de parâmetros do modelo,  $pd_i$  são os dados preditos e  $ob_i$  os dados observados.

Para comparação dos métodos CPP e qPCR, foi realizada a análise de regressão linear, sendo escolhida a técnica de Passing-Bablok (Passing e Bablok, 1983) e Bland Altman, utilizando o *software* MedCalc 19.0.4 (MedCalc® Software, Bélgica) com nível de significância de  $p < 0,0001$  e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). A predição e os resíduos foram obtidos pelo Microsoft Office Excel® (2010).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS

Antes de se dar início às reações de qPCR para quantificação microbiana, deve-se ter garantias de que os resultados sejam representativos e confiáveis. Para atender a essas condições, faz-se uso de alguns testes preliminares, como a especificidade dos iniciadores, o qual dirá se a reação está apresentando uma replicação específica; a elaboração da curva de *melting*, que permite identificar se o sinal emitido pelo corante é proveniente do DNA alvo; assim como a curva padrão, fundamental para se converter os dados obtidos na reação, em resultados de concentração microbiana presente na amostra.

#### 4.1.1 Especificidade dos iniciadores

Abaixo pode-se observar os dados obtidos para a reação de especificidade dos iniciadores, tanto de *L. mesenteroides* (Tabela 2) quanto para *W. viridescens* (tabela 3). Em que pode ser visualizado que para outras espécies de bactérias na reação de qPCR, contendo os pares de primers desenhados para *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, o DNA das outras espécies presentes nas amostras não é replicado, ou seja, os *primers* são considerados específicos para os microrganismos estudados.

Tabela 2: Valores médios para o teste de especificidade para os pares de iniciadores SCAR utilizando DNA extraído de *L. mesenteroides* (controle positivo), outras espécies bacterianas e água milli-Q (controles negativos).

Cepa	Ct	Tm <sup>1</sup>
<i>L. mesenteroides</i>	09,28 ± 0,29	82,25 ± 0,00
<i>Lb. bulgaricus</i>	19,64 ± 0,94	85,33 ± 1,00
<i>Lb. paracasei</i>	17,06 ± 0,26	85,56 ± 0,05
<i>Lb. sakei</i>	18,82 ± 0,18	84,58 ± 0,11
<i>Pseudomonas flourescens</i>	17,74 ± 0,80	88,25 ± 0,25
<i>W. viridescens</i>	19,49 ± 0,20	84,47 ± 0,40
<i>Lb. casei</i>	20,08 ± 1,01	84,66 ± 0,19
<i>Lb. plantarum</i>	15,99 ± 0,92	85,38 ± 0,10
Água Milli-Q	30,74 ± 0,88	71,65 ± 0,00

<sup>1</sup>Temperatura de *melting*.

Fonte: SEVERO (2018).

Tabela 3: Teste de especificidade para os pares de iniciadores recN utilizando DNA extraído de *W. viridescens* (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos).

<b>Cepa</b>	<b>Ct</b>	<b>Tm<sup>1</sup></b>
<i>W. viridescens</i>	12.63	81.15
<i>Lb. paracasei</i>	32.07	71.28
<i>Lb. plantarum</i>	28.76	72.93
<i>Lb. bulgaricus</i>	32.02	80.55
<i>L. mesenteroides</i>	33.51	75.09
<i>P. fluorescens</i>	38.37	87.97
<i>Lb. casei</i>	34.51	82.27
Água MilliQ	37.44	73.25

<sup>1</sup>Temperatura de *melting*.

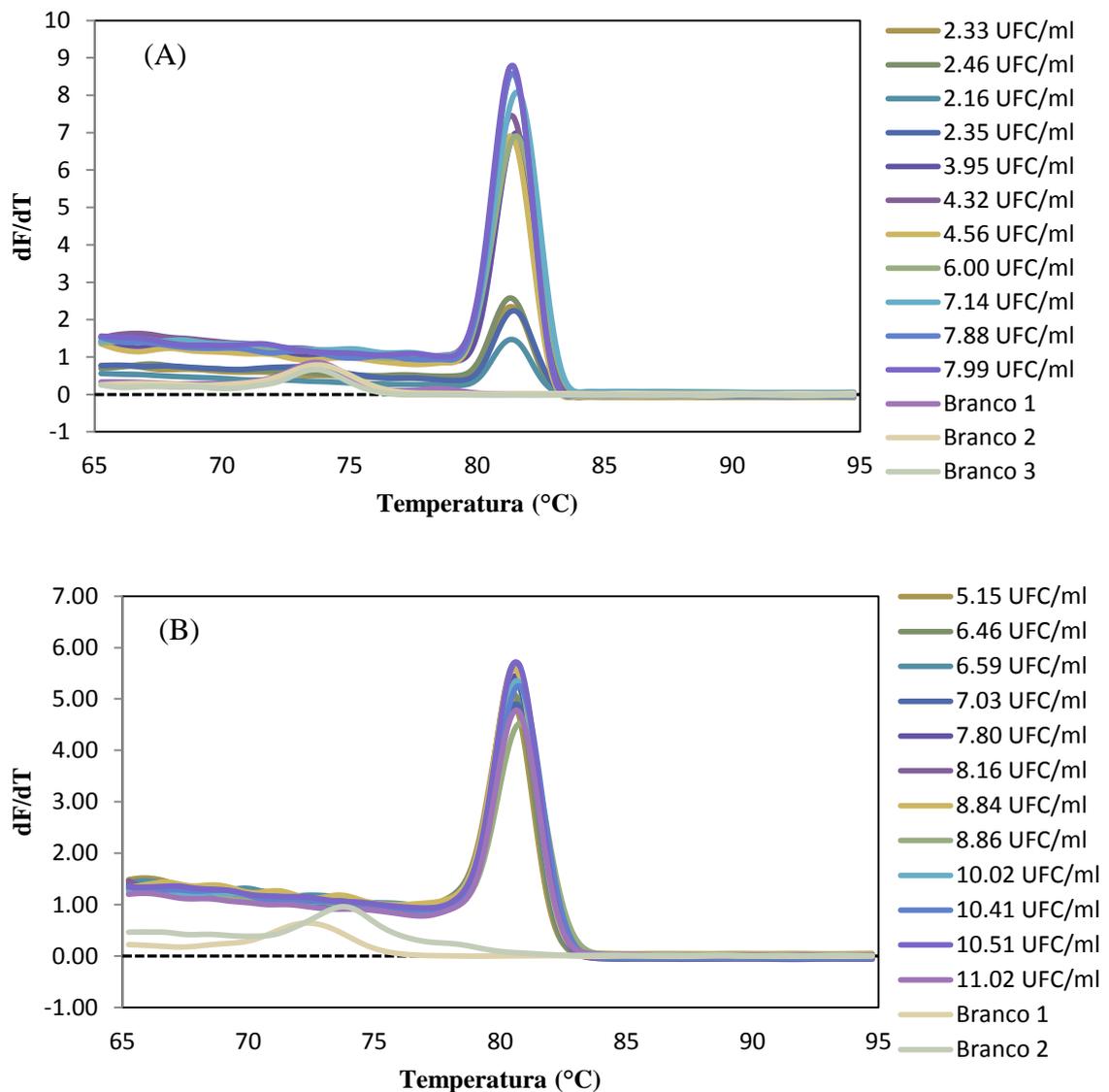
**Fonte:** Adaptado de Martins (2019, no prelo).

#### 4.1.2 Curva de *melting*

Por se tratar de um método utilizando o corante SYBR® *Green* como indicador para quantificação de DNA replicado, após a realização da amplificação, as amostras foram submetidas ao teste de especificidade da reação, a partir da elaboração da curva de *melting*, onde será observado se a reação foi específica, a ponto de quantificar apenas o DNA alvo.

Observando a Figura 1 (A) e (B), pode-se perceber que houve formação de picos, localizados em uma mesma região, sendo esta região onde tem-se a temperatura em torno de 82 °C e 81 °C, para *L. mesenteroides* e *W. viridescens* respectivamente, mostrando assim que a fluorescência observada pelo equipamento para quantificação do DNA é proveniente da ligação do corante com o DNA alvo, e não outro DNA qualquer que esteja presente na amostra, já que as mesmas correspondem às temperaturas de *melting* (Tm) já esperada para cada microrganismo.

Figura 1: Curva de melting para *L. mesenteroides* (A) e *W. viridescens* (B).



dF/dT – derivada da fluorescência em relação a temperatura.

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2019).

Outro fato importante a destacar são os picos que podem ser observados no controle negativo (Branco 1 e Branco 2), os quais podem ser justificados pela formação de dímeros dos iniciadores durante as etapas da ciclagem, como é descrito por Weighardt (2007). Porém o não aparecimento de picos nas temperaturas de 82 °C e 81 °C, para cada um dos casos,

elimina uma possível influência dos reagentes na leitura da amplificação, pois caso os reagentes estivessem contaminados, poderiam ter sido revelados produtos inespecíficos da reação durante a amplificação, apresentando picos em regiões distintas da  $T_m$  esperada.

Alguns estudos realizados, utilizaram os valores de  $T_m$  para verificar a especificidade das reações de qPCR, destacando-se os trabalhos de Comi *et al.* (2016) com *Lb. casei* (83.7 °C), *Lb. rhamnosus*, (81.7 °C), Severo (2018) com *L. mesenteroides* (82.1 °C), Chen G. *et al* (2018) com circovírus suíno (88.0 °C) e ainda Metawilly *et al.* (2018) para o vírus da hepatite C (82.5 °C).

#### 4.1.3 Curva padrão.

A curva padrão utilizada para quantificação do DNA, correlacionando o Ct (ciclo *threshold*) com o número de UFC/mL, foi obtida por meio de experimentos já realizados no grupo de pesquisa, onde para *L. mesenteroides*, Severo (2018) obteve a curva representada pela equação (10) com  $R^2 = 0.9946$  e eficiência (E) = 1,00, e para *W. viridescens*, Martins (2019, no prelo), obteve a equação (11), com  $R^2 = 0.9975$  e eficiência (E) = 1,00. Ressaltando que, com base nos bons índices estatísticos ( $R^2$  e E próximo a 1) atingidos por estas curvas, tem-se confiabilidade nos resultados gerados.

$$Ct = -3.3136 * \log(UFC/mL) + 37.725 \quad (10)$$

$$Ct = -3.1138 * \log(UFC/mL) + 40.47 \quad (11)$$

#### 4.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS CPP E qPCR

A partir dos dados de CPP obtidos por Severo (2018) e Martins (2015) nas mesmas condições de temperaturas (não-isotérmicas), e a médias dos resultados obtidos neste estudo, pela reação de qPCR, pode-se montar a tabela 4, que compara os resultados obtidos pelos dois métodos. A tabela apresenta os valores de  $\log(N/N_0)$ , sendo N a quantificação (UFC/mL) no tempo (t) e  $N_0$  a quantificação alcançada no tempo inicial.

Tabela 4: Comparação CPP e qPCR obtidos pelos métodos de CPP e qPCR.

<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
Tempo de cultivo (h)	log (N/ N <sub>0</sub> ) (CPP)	log (N/N <sub>0</sub> ) (qPCR)	Diferença absoluta
0	0.00 ± 0.2	0.00 ± 0.65	0
2	0.00 ± 0.2	0.13 ± 0.55	0.13
4	0.32 ± 0.2	0.00 ± 0.30	0.32
6	0.51 ± 0.2	0.03 ± 0.46	0.49
8	1.41 ± 0.2	1.62 ± 0.12	0.21
10	1.93 ± 0.2	1.99 ± 0.24	0.06
12	3.12 ± 0.2	2.24 ± 0.31	0.89
16	3.71 ± 0.2	3.67 ± 0.86	0.04
18	4.61 ± 0.2	4.81 ± 0.72	0.2
20	5.23 ± 0.2	5.55 ± 0.10	0.33
22	5.28 ± 0.2	5.66 ± 0.25	0.38

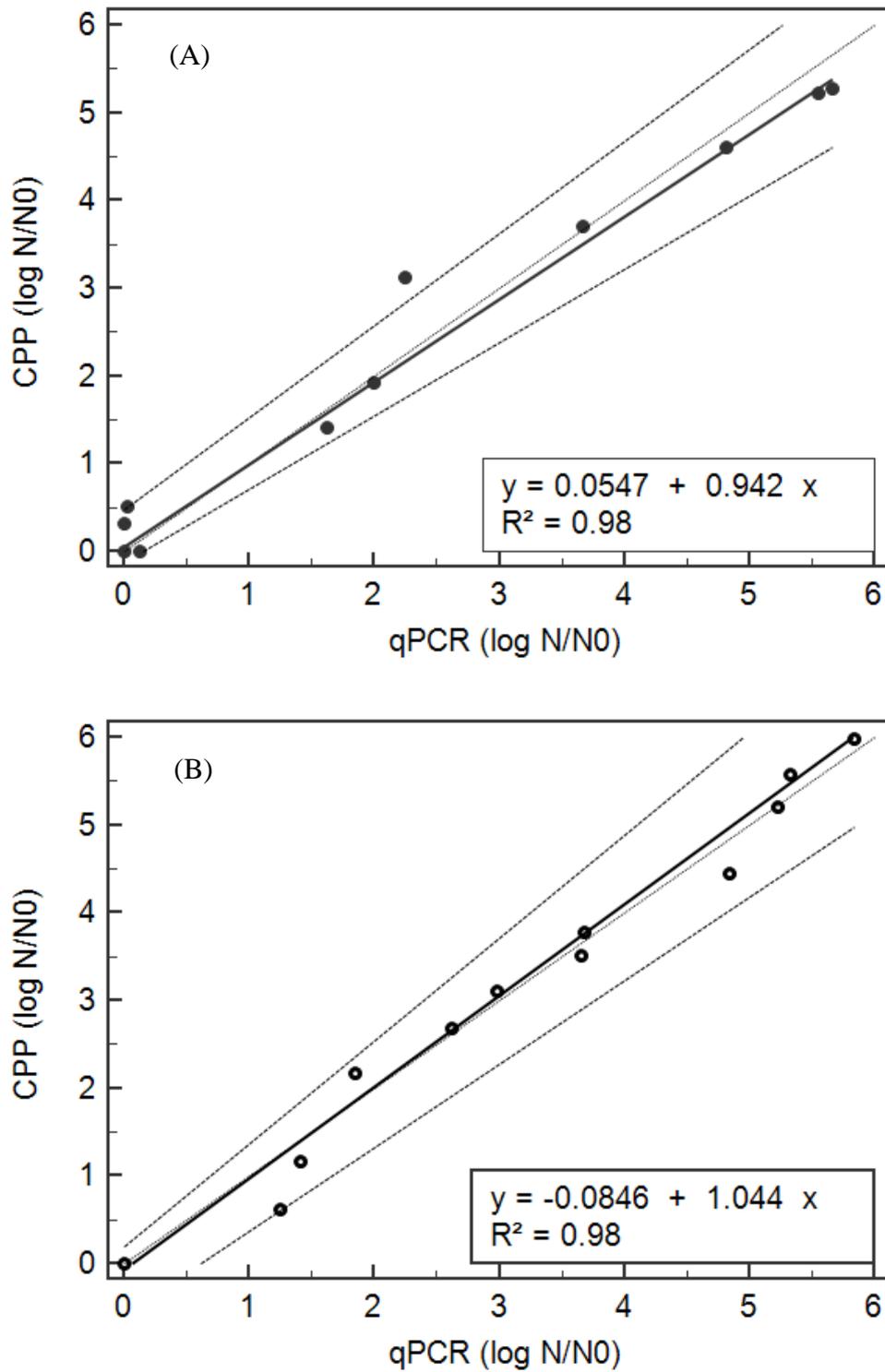
  

<i>Weissella viridescens</i>			
Tempo de cultivo (h)	log N / log N <sub>0</sub> (CPP)	log N / log N <sub>0</sub> (qPCR)	Diferença absoluta
0	0	0.00 ± 0.95	0
11	0.61	1.25 ± 0.49	0.64
25	1.17	1.41 ± 0.24	0.24
51	2.17	1.85 ± 0.27	0.32
75	2.69	2.62 ± 0.55	0.07
125	3.11	2.98 ± 0.15	0.12
156	3.52	3.66 ± 0.92	0.14
168	3.78	3.68 ± 0.00	0.1
190	4.45	4.84 ± 0.25	0.39
200	5.21	5.23 ± 0.19	0.02
215	5.58	5.33 ± 0.34	0.25
248	5.99	5.84 ± 0.10	0.15

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2019).

Com base nos dados apresentados, nota-se que o resultado obtido pela técnica de qPCR não teve grande diferença em relação à técnica de CPP (observação da coluna de diferença absoluta). No entanto, necessita-se a realização de testes estatísticos para comprovação desta afirmação. Deste modo, foi realizada a análise de regressão (Figura 2 (A) e (B)) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Figura 2: Análise de regressão linear do método CPP e qPCR para *L. mesenteroides* (A) e *W. viridescens* (B).



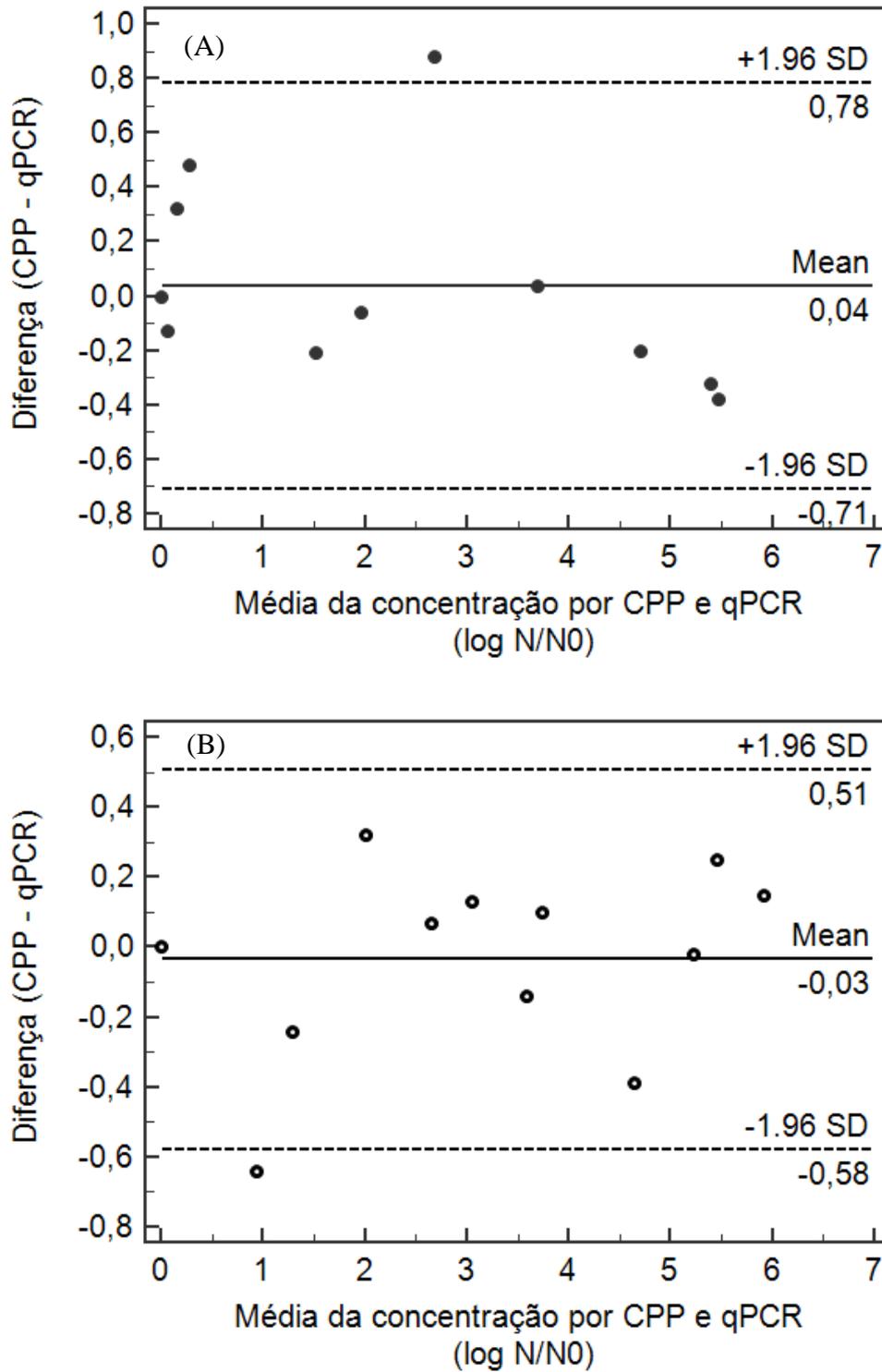
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A reta contínua representa o desvio da linearidade (Regressão de Passing-Bablok), a linha pontilhada fina representa a reta de igualdade ( $y = x$ ) e as linhas pontilhadas em negrito representam o intervalo de confiança de 95%.

Pode-se observar que ambas as curvas tiveram um resultado satisfatório perante as análises feitas, sendo que os dados, na maioria dos casos, apresentam-se entre as linhas do intervalo de confiança (95%), e os coeficientes  $R^2$  obtidos tiveram valores próximos a um, apresentando grande relação linear. Os coeficientes de correlação podem ser tratados como medidas lineares para a relação entre variáveis, mas isto não vai necessariamente fornecer uma boa concordância entre os métodos (BLAND e ALTMAN, 1986), sendo já comprovado por Giavarina (2015), que uma alta correlação não implica explicitamente que haja boa concordância entre os dois métodos, e além disso, dados que parecem estar em um mau acordo podem produzir a correlações bastante altas, sendo ideal a construção dos gráficos de Bland-Altman (Figura 3 (A) e (B)), para poder ter uma visualização melhor da concordância entre os métodos e aí sim, afirmar um bom coeficiente de correlação entre os métodos.

Segundo Ludbrook (2010), a análise de regressão pode ser usada se a preocupação está na calibração de uma medida em relação à outra ou detectar o fator bias entre dois métodos de medição. O objetivo é determinar se um método pode ser seguramente substituído por outro então o método de Bland-Altman pode ser usado. Destaca-se que o mesmo método, é também utilizado por Brazdzionyte (2007), Pekdemir (2013) e Dogan (2014), na verificação de confiabilidade entre diferentes métodos de quantificação.

Figura 3: Avaliação de concordância entre os métodos de CPP e qPCR por Bland-Altman na quantificação de *L. mesenteroides* (A) e *W. viridescens* (B).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Destacam-se os marcadores pretos abertos e fechados como sendo os resultados obtidos para cada um dos casos, a linha preta ao centro das figuras representando a diferença zero (*Mean* ou Fator Bias), e a linha pontilhada preta representa os desvios padrão (SD) para demonstrar um intervalo de confiança de 95% (IC; definido como: média  $\pm$  1,96 desvios padrão).

Para *L. mesenteroides*, o gráfico de Bland-Altman teve uma média de  $-0.04 \pm 0.38$  entre a quantificação pelo método de CPP e qPCR, tendo os limites de concordância os valores de  $-0,71$  e  $0,78$ . Já para *W. viridescens*, a média ficou  $-0.03 \pm 0.28$ , com limites de concordância sendo  $-0,58$  e  $0,51$ . Idealmente, os limites de concordância devem ser o menor possível e a média entre os métodos o mais próximo de zero, tendo-se assim obtido bons resultados com relação a estas análises.

Segundo Dogan (2018), em uma boa concordância, a dispersão dos pontos é pequena e os mesmos ficam próximos à linha do fator bias médio e, por serem uma medida quantificável, o bias médio e os limites da concordância fornecem informações sobre a confiabilidade do novo método de medição. Com a observação dos resultados obtidos, esses dois métodos podem ser usados de forma intercambiável, pois os limites variam de pouco mais de  $1 \log(N/N_0)$ . Ou ainda, pode-se dizer que o método de qPCR pode ser utilizado na quantificação de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em condições não isotérmicas, obtendo resultados confiáveis e comparáveis a técnica de CPP, este último de grande importância pelo fato da técnica de CPP ser um método já estabelecido e de confiabilidade comprovada ao longo de anos (CHAMPAGNE *et al.*, 2011).

#### 4.3 MODELAGEM DAS CURVAS DE CRESCIMENTO

Observa-se na (tabela 5) a  $T_m$  e  $C_t$  obtidos para *L. mesenteroides* e *W. viridescens* a cada tempo determinado foram encontrados os valores médios de  $82.03 \pm 0.4$  °C e  $80.6 \pm 0.2$  °C para a  $T_m$ , respectivamente, para cada caso. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura por Severo (2018) para *L. mesenteroides* e Martins (2019, no prelo) para *W. viridescens*.

Tabela 5: Valores de Ct e Tm obtidos por qPCR para *L. mesenteroides* e *W. viridescens*.

Tempo de Cultivo (h)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	Ct <sup>a</sup>	Tm (°C) <sup>b</sup>
0	30.01 ± 1.0	81.80 ± 0.5
2	30.84 ± 1.9	82.23 ± 0.7
4	31.25 ± 1.0	82.15 ± 0.6
6	29.99 ± 0.7	81.38 ± 0.1
8	24.64 ± 0.2	81.50 ± 0.0
10	23.40 ± 0.4	81.36 ± 0.1
12	22.60 ± 0.4	82.22 ± 0.6
16	17.86 ± 1.3	81.98 ± 0.4
18	14.06 ± 1.1	82.46 ± 0.5
20	11.60 ± 0.2	82.68 ± 0.6
22	11.25 ± 0.4	82.22 ± 0.6

Tempo de Cultivo (h)	<i>Weissella viridescens</i>	
	Ct <sup>a</sup>	Tm (°C) <sup>b</sup>
0	24.35 ± 2.1	80.35 ± 0.1
11	20.45 ± 1.1	80.46 ± 0.1
25	19.94 ± 0.5	80.50 ± 0.1
51	18.85 ± 0.6	80.50 ± 0.0
75	16.18 ± 1.2	80.53 ± 0.0
125	15.96 ± 0.3	80.58 ± 0.1
156	12.95 ± 2.0	80.59 ± 0.1
168	12.89 ± 0.1	81.01 ± 0.3
190	09.27 ± 0.6	80.68 ± 0.0
200	08.07 ± 0.4	80.64 ± 0.0
215	07.74 ± 0.8	80.63 ± 0.0
248	06.16 ± 0.2	80.74 ± 0.1

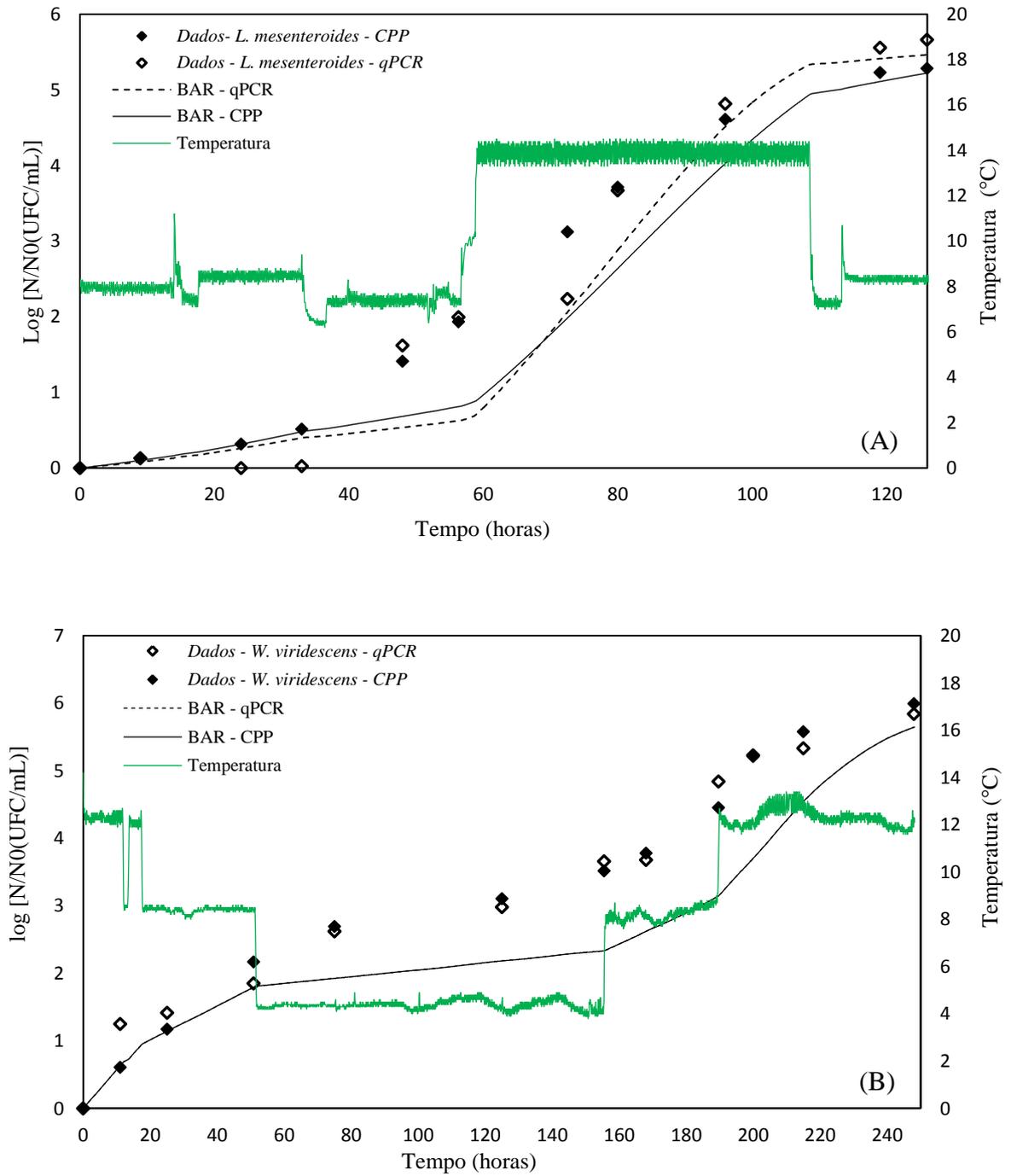
<sup>a</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Ct obtidos em triplicata; <sup>b</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Tm obtidos em triplicata.

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2019).

É interessante ressaltar que os valores de  $T_m$  reafirmam a especificidade quanto às reações de qPCR, devido à utilização do corante SYBR® *Green* para elaboração das curvas de crescimento e, conseqüentemente, trazem a validação dos ensaios realizados.

As curvas de predição do crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* (Figura 4 (A) e (B) respectivamente), foram elaboradas a partir das equações de Baranyi e Roberts (BAR) apresentada no item 3.3 (equações 1 e 2) e dos modelos secundários obtidos por Severo (2018), para os métodos de CPP e qPCR. Na elaboração das curvas de crescimento por CPP, os valores obtidos foram reportados em  $\log(N/N_0)$ , já para obtenção dos mesmos por qPCR, foi realizado o cálculo por interpolação a partir das curvas padrão, com utilização dos valores de  $C_t$ , gerados a partir dos dados de cada uma das BAL, reportando também os dados em  $\log N/N_0$ .

Figura 4: Curvas da predição do crescimento de *L. mesenteroides* (A) e *W. viridescens* (B) em condições não-isotérmicas obtidas pelos métodos de qPCR e CPP.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A linha contínua (cor verde) representa a temperatura observada durante os experimento, os marcadores em pretos sólidos (fechados) representam os resultados experimentais obtidos por CPP, os marcadores em preto vazados (abertos) representam os resultados experimentais obtidos por qPCR para *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, para cada uma das figuras, a linha preta tracejada (sobresposta pela linha contínua preta) representa a predição com o método de qPCR, já a linha preta contínua representa a predição com o método de CPP.

Destaca-se que a sobreposição obtida para a predição de *W. viridescens* com o método de qPCR, foi observada devido a utilização dos mesmos parâmetros de CPP, pois não se tem dados na literatura de modelos secundários utilizando qPCR.

A partir da curva representada pela Figura 4 (A) e (B), nota-se que os dados experimentais obtidos por qPCR e por CPP tem uma boa proximidade (exceto em alguns pontos isolados), comprovando assim os bons resultados obtidos na comparação entre os métodos, apresentados anteriormente, e na substituição dos métodos convencionais pelos novos métodos moleculares. Podem-se observar diversos outros trabalhos realizados na literatura comprovando a representatividade e propondo substituição a métodos de quantificação microbiana convencionais pela substituição ao método de qPCR, como os trabalhos realizados por Garrido-Maestu (2018) com *L. monocytogenes*, Achilleos (2013) com *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus paracasei* e ainda por Panek (2018) com *Talaromyces flavus*.

Com relação à predição realizada pelo modelo de BAR, nota-se que tanto os dados de CPP quanto os dados de qPCR estão situados acima das curvas de predição realizada pelo modelo, onde isto foi observado para as duas bactérias estudadas. Estes resultados obtidos mostram que o crescimento é maior do que o indicado pelo modelo e assim, diz-se que o modelo subestima o crescimento das bactérias, por este motivo, pode-se dizer que o modelo apresenta uma falha perigosa.

Um resultado ruim para a modelagem de crescimento de microrganismos significa que o modelo não fornece representatividade do que é observado experimentalmente, isto pode ocorrer de duas formas, subestimando ou superestimando o seu crescimento. O primeiro caso é observado quando o modelo representa um crescimento microbiano menor em comparação com os dados obtidos experimentalmente (o microrganismo cresce mais do que o modelo indica), já o segundo revela que o modelo indicou um crescimento microbiano acima do que é observado experimentalmente (o microrganismo não cresce tanto quanto o modelo

indica). Estes dois resultados não são desejáveis ao se estabelecer um modelo para predição do crescimento microbiano, porém, no melhor dos casos, se espera que o modelo superestime o crescimento ao invés de subestimar, pois assim tem-se ainda um limite maior de segurança ao se tratar da contaminação de produtos alimentícios, mesmo isto podendo gerar maiores custos com relação à indicação de menor tempo de vida útil aos alimentos (SILVA, 2016).

No caso do modelo apresentado para a *L. mesenteroides* (Figura 4 - A), observa-se que a predição para o método de CPP subestima os dados experimentais, dessa forma o modelo secundário deve ser revisto, bem como outros modelos não-isotérmicos devem ter suas predições testadas. Esta mesma constatação pode ser vista para o caso da *W. viridescens* (Figura 4 - B) e ao se analisar o trabalho realizado por Costa (2016) que apenas difere quanto ao modelo estar se tratando agora de condições variadas de temperatura.

O mesmo efeito pode estar ocorrendo ao tratar-se de mesma forma os dados de qPCR, já que no início do crescimento (fase lag) os dados experimentais apresentam-se próximos à curva de predição, só começando a se distanciar durante a fase exponencial, e aparentemente, tendendo a se aproximar durante a fase estacionária. Esta última observação também demonstra que a adaptação do microrganismo não pode ser predita pelo modelo, podendo a mesma ser mais rápida, apresentando uma queda não muito expressiva no crescimento durante a variação de temperatura (como é neste caso), ou mais lento.

No momento em que *W. viridescens* é submetida à temperatura de 4 °C, nota-se que os dados experimentais seguem acima do modelo predito e tem um crescimento mais acentuado do que o modelo estima, isto poderia ser explicado por um maior tempo de adaptação que o microrganismo passa nessa temperatura, fazendo com que a bactéria não apresente o comportamento predito no modelo secundário, pois a adaptação do microrganismo não pode ser predita pelo mesmo. Este fato pode ser comparado com o que é descrito por Hudson (1993) e (Martins, 2015), onde os mesmos observam que as células microbianas adaptadas às temperaturas mais altas e então transferidas para temperaturas mais baixas apresentam fase de adaptação mais longa, assim a adaptação do microrganismo em uma nova temperatura, vai gerar falhas no modelo preditivo, pois o mesmo não vai identificar esse atraso e assim, nesse caso, irão subestimar o crescimento microbiano.

Os índices estatísticos referentes ao ajuste de Baranyi e Roberts (1994) são apresentados na tabela 6, em que se pode analisar as diferenças entre os resultados obtidos para as duas BAL, com relação ao método tanto de CPP, quanto de qPCR.

Tabela 6: Índices estatísticos para predição do crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* sob condições não isotérmicas.

Índices	<i>L. mesenteroides</i>		<i>W. viridescens</i>	
	CPP	qPCR	CPP	qPCR
<b>R<sup>2</sup></b>	0.896	0.942	0.942	0.917
<b>RMSE</b>	1.110	0.605	0.889	0.925
<b>BIAS</b>	0.730	1.020	0.749	0.692
<b>Exatidão</b>	1.373	1.894	1.346	1.443

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Um bom e representativo modelo que é avaliado segundo índices estatístico, deve apresentar um fator bias e Exatidão igual ou próximos a 1, o que revela um acordo perfeito entre valores preditos e observados, sendo que, para curvas de crescimento microbiano, um fator bias maior que 1 indica que o modelo falha de forma segura e por outro lado, se o fator bias apresentado for menor que 1, isto indica que o modelo falha de forma perigosa. Se tratando da raiz do erro médio quadrático (RMSE), seu valor deve ser o mais baixo possível, indicando assim uma boa capacidade dos modelos em representar os dados experimentais. Já o valor de  $R_a^2$  deve ser maior que 0.9, o que só não é observado ao se tratar de *L. mesenteroides* com método de CPP, mostrando assim a baixa correlação entre a curva de predição e dados experimentais.

Em condições de temperatura decrescente, o modelo subestimou o crescimento experimental, caracterizando uma previsão perigosa, o que também é observado por Silva, (2016). Estas previsões perigosas podem ter se dado pelo fato de ser necessário um tempo para a transferência de calor da atmosfera da BOD para o meio de cultura inoculado, retardando a resposta microbiana a essa mudança de temperatura.

Para ter-se uma boa capacidade preditiva de um modelo matemático, o modelo primário deve ter boa representatividade, os modelos secundários necessitam representar a variação dos parâmetros do modelo primário em função da temperatura de forma adequada, e ainda, se espera que a capacidade preditiva dos modelos não seja reduzida quando houver variações bruscas de temperatura. Martins (2015) destacou que os erros na estimativa dos valores dos parâmetros do modelo secundário ocasionam erros nas predições do crescimento em condições não isotérmicas. O mesmo problema pode estar sendo relacionado ao experimento realizado e produzindo os erros observados. Longhi (2013) ressalta que os complexos mecanismos de adaptação microbiana (os quais devem ser representados pelos modelos) são o maior dos desafios encontrados na elaboração de modelos não isotérmicos.

Costa (2016) demonstrou também que estudos apresentam problemas na previsão ao avaliar o crescimento de microrganismos com variações de temperatura próximas da temperatura mínima para o crescimento microbiano, por exemplo, *Pseudomonas* spp. (CORRADINI, 2015) e *L. monocytogenes* (XANTHIAKOS, 2006). Estas constatações revelam a dificuldade quanto a avaliação do crescimento microbiano a baixas temperaturas (como a temperatura de refrigeração) e grande variação de temperatura a ser avaliada pelo modelo, assim ressaltamos a necessidade testar outros de ajustes em modelos secundários, utilização de outros modelos não isotérmicos, buscando resultados com maior representatividade.

## 5 CONCLUSÃO

A extração do DNA de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* apresentou bom resultados expressos durante a reação, onde foi observado picos nas temperaturas de *melting* esperada para cada microrganismo.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram a eficiente substituição do método de contagem em placas pelo método de qPCR, o que foi confirmado pela análise de correlação juntamente com a análise de Bland-Altman. Além dos pontos experimentais apresentados na curva de crescimento estarem próximos ao se comparar os métodos.

Com relação ao modelo preditivo proposto, notou-se que a utilização das equações de BAR não teve bons resultados, subestimando o crescimento das duas BAL estudadas, onde os problemas encontrados possivelmente estão relacionados ao modelo secundário utilizado. Estudos futuros devem ser realizados com utilização de outros modelos para análises preditivas do crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* (como o modelo Logístico de Gompertz) e avaliando também a utilização de outros modelos secundários na tentativa de obter melhores resultados.

Mesmo com modelos não expressando bons resultados, o avanço positivo trazido pelos métodos moleculares tendendo a expressar bons resultados, de forma mais rápida e precisa, mesmo em condições de crescimento não isotérmico, mostrando a importância da microbiologia preditiva e constante evolução apresentada por esta área de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v.36, p.286–295, 2013.
- BARANYI J., ROBERTS T. A. Review Paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277–294, 1994.
- BARANYI J., ROBERTS T.A., MCCLURE P.J. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiol.**, v. 10, p. 43-49, 1993.
- BILAL A.P., IRFAN A., RATHERB M.K., AL-SADOONA, AL-SHAMMARI, FANAR H. Pharmaceutical significance of *Leuconostoc mesenteroides* KS-TN11 isolated from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 509-514, 2018
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, p.307–310, 1986.
- BLICKSTAD E., MOLIN G. The microbialflora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, p. 45–56, 1983.
- BORCH E., KANT-MUERMANS M.L., BLIXT Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 103–120, 1996.
- BRAZDZIONYTE J., MACAS A. Bland-Altman analysis as an alternative approach for statistical evaluation of agreement between two methods for measuring hemodynamics during acute myocardial infarction *Medicina (Kaunas)*, Vol 43, pp. 208-214, 2007.
- BROUGHALL J.M., BROWN C. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development and application of three-dimensional models to predict bacterial growth. **Food Microbiol**, v. 1, p. 13-22, 1984.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, p.169–193, 2000.

CAMARGO, A. R. DA S. Modelagem do crescimento de bactérias ácido-lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 192, 2015.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.

CHEN G., TANG X., SOL Y., ZHOU L., LI D., BAI Y., MAI K., LI Y., WU Q., MA J. Development of a SYBR *Green*-based real-time quantitative PCR assay to detect PCV3 in pigs. **Journal of Virological Methods**. Vol. 251, Pages 129-132, 2018.

COLLINS M.D., SAMELIS J., METAXOPOULOS J., WALLBANKS S. Taxonomic studies on some *leuconostoc-like* organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 595-603, 1993.

COMI, G. *et al.* *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus sakei* as bio-protective culture to eliminate *Leuconostoc mesenteroides* spoilage and improve the shelf life and sensorial characteristics of commercial cooked bacon. **Food Microbiology**, v. 58, p. 16–22, 2016.

CORRADINI, M, PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. **J. Appl. Microbiol**, 99:185-00, 2005.

COSTA J.C.C.P. *et al.* Modelagem Preditiva do Crescimento de *Lactobacillus Viridescens* sob Condições Não Isotérmicas. **Procedia Food Science**. Vol. 7, p. 29 - 32, 2016.

DALCANTON, F.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; ARAGÃO, G. M. F.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Modelling growth of *Lactobacillus plantarum* and shelf life of vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures. **International Journal of Food Science Technology**, v. 48, p. 2580–2587, 2013.

DEEPAK *et al.* Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. **Current Genomics**, v. 8, n. 4, p. 234–251, 2007

DEVLIEGHERE F., DEBEVERE J., VAN IMPE J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 231-238, 1998.

DIEZ, A.M., SANTOS, E.M., JAIME, I., ROVIRA, J. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 154–161, 2008<sup>a</sup>.

DIEZ, A.M., URSO, R., RANTSIOU, K., JAIME, I., ROVIRA, J., COCOLIN, L. Spoilage of blood sausages morcilla de Burgos treated with high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 246–253, 2008b.

DIEZ, A.M., SANTOS, E.M., JAIME, I., ROVIRA, J. Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of Morcilla de Burgos. **Meat Science**, v. 81, p. 171–177, 2009.

DIEZ, A.M., BJÖRKROTH, J., JAIME, I., ROVIRA, J. Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de Burgos previously inoculated with *Weissella viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, 168–177, 2009a.

DOĞAN N. O. Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agrément. **Turkish Journal of Emergency Medicine**. Vol. 18, Issue 4, Pages 139-141, 2018.

DOĞAN N.Ö., ŞENER A., GÜNAYDIN G.P., *et al.* The accuracy of mainstream end-tidal carbon dioxide levels to predict the severity of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations presented to the ED. **Am J Emerg Med**, Vol 32, pp. 408-411, 2014.

ELIZAQUÍVEL, P.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. A TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 62–71, 2008.

FALENTIN, H.; POSTOLLEC, F.; PARAYRE, S.; HENAFF, N.; LE BIVIC, P.; RICHOUX, R.; THIERRY, A.; SOHIER, D. Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.10–19, 2010.

FERREIRA, L. D. Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido lácticas em presunto fatiado. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, 2004.

FU, B.; LABUZA, T. P. Considerations for the Application of Time-Temperature Integrators in Food Distribution. **Journal of Food Distribution Research**, v. 23, p. 9-18, 1992.

GARRIDO-MAESTU A., CARVALHO S.J., PRADO M. Detecção rápida e sensível de *listeria monocytogenes* viável em produtos alimentícios por um protocolo baseado em filtração e qPCR. **Microbiologia Alimentar**. Vol. 73, p. 254-263, 2018.

GARRIDO-MAESTU A., FUCIÑOS P., AZINHEIRO S., CARVALHO J., PRADO M. Systematic loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection and characterization of *Salmonella spp.*, Enteritidis and Typhimurium in food samples. **Food Control**. v. 80, p. 297–306, 2017.

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

GIAVARINA D. Understanding Bland Altman analysis. **Biochem Med**, v. 25, pp. 141-151, 2015.

GOUGOULI M., KOUTSOUMANIS K.P. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. **International Journal Food Microbiol.**, v. 140, p. 254-262, 2010.

GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B., GIVSKOV, M. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, 79–97, 2002.

HAMASAKI Y., AYAKI M., FUCHU H., SUGIYAMA M. & MORITA H. Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 3668–3671, 2003.

HAMMES W.P., WEISS N., HOLZAPFEL W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. **The Prokaryotes**, p. 1535–1594, 1991.

HANNA, S.E., CONNOR, C.J., WANG, H.H. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. **Journal Food Science**, v. 70, p. 49–53, 2005.

HAN Y., JIANG Y., XU X., SUN X., XU B., ZHOU G. Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. **Meat Science**, p. 682-688, 2011.

HEID, C. *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, p. 986–994, 1996.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN C. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 467–494, 2004.

HUDSON, J.A. Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.16, p.274-276, 1993.

HUGAS M., GARRIGA M., MONFORT J.M. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. **Meat Science**, v. 62, p. 359-371, 2002.

HU P., ZHOU G., XU X., LI C., HAN Y. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. **Food Control**, p. 99-104, 2009.

JUNG, M. Y.; CHANG, Y. H.; KIM, W. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. **Journal Applied Microbiology**, v.108, p.1694–1701, 2010.

KARABAGIAS I., BADEKA A., KONTOMINAS M.G. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v. 88, p. 109-116, 2011.

KILCAST D., SUBRAMANIAM P. Chapter1 - introduction, D. Kilcast, P. Subramaniam (Eds.), *The Stability and Shelf Life of Foods*, **CRC Press**, Boca Raton (2000).

KREYENSCHMIDT J., HUBNER A., BEIERLE E., CHONSCH L., SCHERER A., PETERSEN B. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of

lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology.**, v. 108, p. 510-520, 2010.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

LEBERT I., LEBERT A. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, n. 6, p. 968–984, 2006.

LE DRÉAN, G. *et al.* Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1–2, p. 100–107, 2010.

LONGHI D. A., DALCANTON F., ARAGÃO G.M.F., CARCIOFI B.A.M., LAURINDO J.B. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions, **J. Theor. Biol.**, v. 335, p. 88-96, 2013.

LONGHI, D. A. Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não isotérmicas. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 114, 2012.

LUDBROOK J. Confidence in Altman-Bland plots: a critical review of the method of differences. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Vol 37, pp. 143-149, 2010.

MALORNY, B. *et al.* Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1299–1304, 2008.

MARTÍNEZ, N., MARTÍN, M.C., HERRERO, A., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M.A., LADERO, V. qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: significance for food quality. **Trends Food Sci. Technol**, v. 22, p. 367–376, 2011.

MARTINS, W. F. Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas. **Universidade Federal de Pernambuco**, 2015.

MARTINS W. F. Modelagem do crescimento de bactérias ácido-lácticas em culturas puras e mistas usando o método da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), tese de doutorado. **Universidade Federal de Santa Catarina**. 2019, no prelo.

MASANA M.O. Limitations and extensions of predictive microbiology models, M. Phil (Thesis). **University of Reading**, United Kingdom, 1999.

MASCO, L. *et al.* Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 351– 357, 2007.

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

MCKELLAR R.C., LU X. Modelando Respostas Microbianas em Alimentos. **CRC Press**, Boca Raton ( 2004 )

MENEZES N.M.C. *et al.* Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham, **Meat Science**, v.139, p. 113-119, 2018.

MOCO, S. *et al.* A liquid chromatography-mass spectrometry- based metabolome database for tomato A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato 1. **Plant physiology**, v. 141, n. September 2015, p. 1205–1218, 2006.

MONOD J. The growth of bacterial cultures. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 371-394, 1949.

NIVEN C.F.J., EVANS J.B. Lactobacillus viridescens nov. spec., a heterofermentative species that produces a *Green* discoloration of cured meat pigments. **Journal Bacteriol**, 73: 758-759, 1957.

OLIVEIRA, A. R. R. DE. Quantificação de DNA nuclear e DNA mitocondrial por PCR em tempo real. **Universidade de Lisboa**, p. 113, 2009.

O'SULLIVAN L., ROSS R.P., HILL C. Potential of bacteriocin- producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, **Biochimie**. p. 593 – 604, 2002

PANEK, J., FRAC, M. Desenvolvimento de um ensaio qPCR para a detecção de *talaromyces flavus* resistentes ao calor. **Revista internacional de microbiologia de alimentos**. Vol. 270, p. 44-512, 2018.

PAUDEL, D.; JARMAN, R.; LIMKITTIKUL, K.; LUNGTHONG, C.; CHAMNANCHANUNT, S.; NISALAK, A. Comparison of real-time SYBR *Green* dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **North American Journal of Medical Sciences**, v.3, p.478-85, 2011.

PEKDEMIR M., CINAR O., YILMAZ S., YAKA E., YUKSEL M. Disparity between mainstream and sidestream end-tidal carbon dioxide values and arterial carbon dioxide levels **Respir Care**, Vol. 58, pp. 1152-1156, 2013.

PELEG M. Modelling microbial populations with the original and modified versions of the continuous and discrete logistic equations. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 37, p. 471-490, 1997

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification. **Springer**, 2008.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v.28, p.848-861, 2011.

POVEDA J.M., RUIZ P., SESEÑA S., PALOP M.L. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process, **Food Science and Technology**, p. 129 – 136, 2017.

RATKOWSKY D.A., OLLEY J., MCMEEKIN T.A., BALL A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal Bacteriol**, v. 149, p. 1-5, 1982.

ROSS T. Predictive food microbiology models in the meat industry, **Meat and Livestock Australia**. p. 196, 1999.

SANT'ANNA, F. M. Bactérias ácido-lático de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes: isolamento, identificação

molecular, avaliações in vitro e in vivo do potencial probiótico. Dissertação de mestrado pós graduação em Ciência Animal, **Universidade Federal de Minas Gerais**, p. 107, 2014.

SANTOS, B. M. DOS. Identificação molecular de bactérias lácticas presentes no caldo de cana-de-açúcar. **Universidade Federal de Pernambuco**, p. 87, 2012.

SANTOS E.M., JAIME I., ROVIRA J., LYHS U., KORKEALA H., BJÖRKROTH J. Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”, **International Journal of Food Microbiology**. p. 285-296, 2005.

SCHAFFNER D.W., LABUZA T.P. Predictive microbiology: where are we and where are we going?. **Food Technol**, v. 51, p. 95-99, 1997.

SEVERO D. S. Modelagem do crescimento de *Ieuconostoc mesenteroides* em cultura pura e mista usando PCR quantitativo (qPCR), **Universidade Federal de Santa Catarina**. p. 1-106, 2018.

SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L., JOHNE, R. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. **J. Appl. Microbiol.** v. 113, p. 1014–1026, 2012.

SILVA, N. B. DA *et al.* Modeling the growth of *Lactobacillus viridescens* under non-isothermal conditions in vacuum-packed sliced ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, p. 97-101 2017.

SILVA N.B., LONGHI D. A., MARTINS W.F., ARAGÃO G.M.F., CARCIOFI B.A.M. Mathematical modeling of *Lactobacillus viridescens* growth in vacuum packed sliced ham under non isothermal conditions. **Procedia Food Science**. P. 33-36, 2016

SILVA, N. B. Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado a vácuo. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 1–89, 2015.

SLONGO A.P., ROSENTHAL A., CAMARGO L.M.Q., DELIZA R., MATHIAS P., ARAGÃO G.M. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure, LWT - **Food Science and Technology**. v. 42, p. 303-306, 2009.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética molecular humana**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

SOPER H. E. *et al.* On the Distributions of the Correlation Coefficient in Small Samples. Appendix II to the Papers of “Student” and R. A. Fisher. **A Cooperative Study, Biometrika**, 11, 328–413, 1916.

VAN BOEKEL M.A.J.S. Statistical aspects of kinetic modelling for food science problems. **Journal Food Science**, v. 61, p. 477-485, 1996.

VERMEIREN, L. *et al.* In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 33–42, 2005.

WEIGHARDT, F. GMO quantification in processed food and feed. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 11, p. 1213–1214, 2007.

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

WHITING R.C., BUCHANAN R.L. Microbial modelling. **Food Technol**, v. 48, p. 113-120, 1994.

XANTHIAKOS, K, SIMOS, D, ANGELIDIS, A, NYCHAS, G, KOUTSOUMANIS, K. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized milk. **J. Appl Food. icrobial**, 100:1289-98, 2006.

ZHANG, G.; HOLLEY, R. A. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. **Food Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 633–644, 1999.

ZURERA-COSANO G., CASTILLEJO-RODRÍGUEZ A.M., GARCÍA-GIMENO R.M., RINCÓN-LEÓN F. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. **Food Control**, v. 17, p. 429-438, 2006.

ZWIETERING M., JONGENBURGER I., ROMBOUTS F., VANT RIET K. Modeling of the bacterial-growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875-1881, 1990.

ZWIETERING M.H., ROMBOUTS F.M., VAN'T RIET K. Some aspects of modelling microbial quality of food, **Food Control**. v. 4, p. 89 – 96, 1993.