

Ana Paula Rosa da Silva Camargo

**MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁCTICAS EM CULTURA PURA E MISTA SOB CONDIÇÕES
ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS DE CULTIVO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Doutor em Engenharia de Alimentos
Orientador: Prof.^a Dr.^a Gláucia Maria
Falcão de Aragão
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Francieli
Dalcanton

Florianópolis
2015

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

Camargo, Ana Paula Rosa da Silva

Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo / Ana Paula Rosa da Silva Camargo ; orientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão ; coorientadora, Francieli Dalcanton. - Florianópolis, SC, 2015.

194 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Bactérias ácido lácticas. 3. Deterioração. 4. Microbiologia preditiva. 5. Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR). I. Falcão de Aragão, Gláucia Maria. II. Dalcanton, Francieli. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**“MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM
CULTURA PURA E MISTA SOB CONDIÇÕES
ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS DE
CULTIVO”**

Por

Ana Paula Rosa da Silva Camargo


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



Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora



Prof.ª. Dra. Francieli Dalcanton
Coorientadora

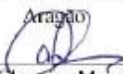


Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador

Banca Examinadora:



Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão de
Aragão



Prof.ª. Dra. Cleonice Mendes Pereira
Sarmiento



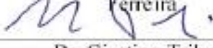
Dra. Natália Mezzomo



Prof.ª. Dra. Morgana Zimmermann



Prof.ª. Dra. Sandra Regina Salvador
Ferreira



Dr. Giustino Tribuzi

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho para as
pessoas que mais amo neste mundo. Ao
meu amor Rodrigo, ao meu pai Alberto
e toda minha família de coração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me mostrado que eu seria capaz de vencer todos os obstáculos e dificuldades colocando em meu caminho muitos amigos generosos, companheiros e carinhosos.

Aos meus pais, em especial meu pai Alberto, por oportunizar todos os meus estudos e apoiar a carreira que escolhi. Meu pai é minha fortaleza, meu melhor amigo, todos os seus ensinamentos, carinho e amor incondicional foram imprescindíveis para a minha formação. Como ele sempre me diz: “Guarde todas pedras que surgirem em seu caminho para um dia construíres o seu castelo” parafraseando Fernando Pessoa.

Ao meu marido, Rodrigo, que me fornece um combustível diário, o AMOR, para que eu realize com sucesso todas as tarefas. Obrigada pelo carinho, zelo, paciência, apoio, conversas, conselhos, brincadeiras para aliviar minhas ansiedades, companheirismo, cumplicidade, lealdade e, por ter feito eu lembrar este amor tão forte que nos acompanha a muito tempo. Obrigada por cuidar tanto de mim, sempre me poupando de momentos tristes, nos quais eu poderia ter sofrido. Você aguenta tudo por mim, me faltam palavras para expressar como EU TE AMO!

Ao meu “filho cachorro”, Stuart, que não poderia ficar de fora, por toda a gratidão que demonstra com seus novos pais adotivos, e pelas tantas vezes que tentou comer as cópias da Tese com as correções da banca examinadora.

À minha família, por serem pessoas tão especiais e me apoiarem em todos os momentos.

À minha orientadora, Gláucia, por ter acreditado em mim e sido uma das minhas tantas “mães” em Florianópolis. Agradeço seus ensinamentos, conselhos, conversas, por secar minhas lágrimas nos momentos difíceis e sempre ter uma palavra amiga acompanhada de um sorriso.

À minha coorientadora, Francieli Dalcanton, por toda dedicação nas correções deste trabalho. Sua colaboração foi essencial em todos os aspectos. Agradeço por todos os e-mails de correções com conselhos carinhosos, contribuindo para que o fechamento da parte escrita estivesse perfeito.

À minha amiga e também relatora desta Tese, Morgana Zimmermann (a Ruth) e família, pelos momentos maravilhosos que tivemos em Florianópolis e Trombudo Central. Agradeço pelos momentos difíceis também porque sem eles eu não teria amadurecido com relação aos princípios de uma amizade verdadeira. Esta supera tudo!

Aos membros da banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Morgana Zimmermann, Prof.^a Dr.^a Cleonice Sarmiento, Prof.^a Dr.^a Sandra Ferreira, Dr.^a Natália Mezzomo e Dr. Giustino Tribuzi, pelas correções e elogios dedicados a mim durante a defesa desta Tese. Com certeza, todas as correções acrescentaram muito a versão final deste trabalho.

Aos professores, Prof.^a Dr.^a Alcilene Monteiro, Prof. Dr. João Laurindo, Prof.^a Dr.^a Sandra Ferreira e Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow, por terem sido muito importantes quando fiquei doente durante o doutorado, e por terem apoiado minha permanência em Florianópolis para concluir meus estudos.

À minha “amiuga” do coração, Leticia Haberbeck (a Nina) e família, pelos momentos inesquecíveis da nossa amizade e por ter sido uma irmã nesta jornada. Seu apoio e carinho foram fundamentais para que eu enfrentasse meus medos. Cuidou tanto de mim, e até hoje se preocupa para saber como estou mesmo morando do outro lado do oceano. Em especial agradeço à Alzira Haberbeck (uma mãe de coração incomparável) e Marcos Haberbeck por terem sido os olhos do meu pai, zelando e proporcionando a minha qualidade de vida. Vocês me acompanharam até no dia da defesa da Tese. O meu eterno obrigada a vocês!

À minha mana amada, Renata Monteiro, pelos longos anos de amizade e cumplicidade. Sou muito agradecida a você e sua família pelo amor dedicado a mim. Eu também devo o meu sucesso a vocês.

Aos meus amigos irmãos, James Drummond, Fabiano Bernardelli (Massa) e suas famílias, por terem sido fundamentais nestes anos de convívio e amizade sincera. Nunca faltou uma palavra de carinho de vocês, sempre tive a certeza de que estariam por perto quando eu precisasse. Inclusive você James, esteve presente na minha defesa da Tese dedicando seu tempo para me apoiar.

Ao meu amigo, Daniel Longhi, pelas inúmeras conversas divertidas nas nossas reuniões no Engebio quando discutíamos as infinitas rotinas não isotérmicas do Matlab. Obrigada pela paciência e disponibilidade para me ajudar, que aliás ainda o fazes até hoje.

À Denise Moritz minha amada, pessoa incomparável que tive o prazer de conhecer e ficar amiga. Nossas conversas ficaram em minha memória, sempre lembrarei com carinho dos teus conselhos de mãe amorosa.

Ao meu super amigo querido, “Jan” Correia, pelas longas conversas, planos de pesquisa eterna com a microbiologia preditiva e muitas noites de experimentos no laboratório Engebio. Foram muitas

risadas e desabafos nesta nova amizade que surgiu e ficou cada dia mais forte.

À minha amiga, Deia Tremarim, dona do melhor abraço deste mundo, pelas risadas, conversas, saídas para tomar suco e comer sushi, que aliás ela ama. Pessoa amável que está sempre pronta para ajudar quando precisamos. Como é bom saber que você está por perto!

À dupla querida, Kellen e Kelin, pelas boas horas de conversas, risadas, comilanças, jantares maravilhosos, diversão eterna na malhação, palavras de apoio e pela companhia nas madrugadas de experimentos no Engebio.

Aos amigos do Engebio, Mélo di Schmidt, Jaciane Ienczak, Silvana Licodiedoff, Dani Remonato, Juliana Ribeiro, Jonathan Bork, Rosana Henriques, Lauren Bergmann, Francielli Martinhago, Wiaslan Martins, Geórgia Aimée, Manuela Feltes, Mara Cristina Picoli e Carol Krebs, pelas longas conversas, momentos infinitamente divertidos no Engebio, por sempre ajudarem quando estive doente, pelas visitas, pelas “baladas”, pelos “barzinhos”, parcerias nas noites de experimentos no Engebio e pelas brincadeiras com a “Ana Bal”.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Solos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), Dr. Rafael, Prof. Dr. Marcio e Dr. Adimir, pela parceira que foi firmada com o laboratório de Engenharia Bioquímica (Engebio) possibilitando a realização dos experimentos desta Tese com o uso das técnicas moleculares. Um agradecimento em especial para o Rafael, por todas explicações, auxílio e disponibilidade para que eu pudesse realizar meus experimentos no MIP.

Às minhas “ICs”, Silmara Zandonai, Helô Miot, Raquel Lo Turco, Fernanda Henrique, Fernanda Lazzari, Marielle Colombi, Fernanda Marques, Camila Paganini, Maria Eduarda Kruger e Gabrielle Wiederkehr, pela cumplicidade e comprometimento com o trabalho, noites sem dormir realizando os experimentos, momentos de risadas, conversas e estudos. À Marielle e a Camila, que trabalharam por um período maior comigo, o meu agradecimento e carinho especiais.

Ao “Seu Zé”, como o chamamos carinhosamente, por todos os cafés quentinhos nas manhãs do Engebio, pelas maçãs que eu sempre ganhava quando passava a noite trabalhando e pelo carinho. Foram inúmeras nossas conversas e explicações, sobre o que eram os meus experimentos, “Seu Zé” tem um grande interesse em aprender. Sempre que me encontrava no Engebio após uma noite de trabalho ele dizia: “Tadinha!!!”.

À Milene Castoldi, Nathalia Raza, Priscila Carvalho, Riveli Brigido e Leidiani Müller, por ter tido a oportunidade de conhecê-las, morarmos juntas e compartilharmos de ótimos momentos, boas risadas, longas conversas, madrugadas de filmes, festas e passeios no shopping. Às amigas, Milene e Riveli, meu agradecimento especial por terem passado algumas noites no Engebio me fazendo companhia mesmo sem precisarem.

À minha família de coração aqui de São Paulo, Josefa, Tânia, Melina, Gabriel e Gabriela, que bom que eu encontrei vocês! Tudo faz mais sentido, a vida se tornou ainda melhor e a cada dia tenho o prazer de relembrar e descobrir nossos laços de amor.

Aos amigos especiais, Guilherme de Almeida e Debora Gomes, pela amizade sincera, pelas palavras de carinho na finalização deste trabalho e pela acolhida afetuosa, assim que vim morar em São Paulo.

Aos meus anjos e amigos protetores, que estão sempre zelando por mim, sou imensamente grata por ter esta honra de conviver com todos vocês.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro Tecnológico e Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos pelo apoio acadêmico e infraestrutura oferecida para a realização desta tese de doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, ao coordenador Prof. Dr. Marco di Luccio e a subcoordenadora Prof.^a Dr.^a Sandra Ferreira pela maestria no desempenho da função permitindo que eu tivesse suporte e estrutura para o desenvolvimento de minhas atividades.

À Capes, pela concessão de bolsa de estudos.

À todos, novamente, o meu muito obrigada de coração!

Nada é capaz de deter aquele que busca a verdade.
(Galileu Galilei)

Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo
está vendo e pensar uma coisa diferente.
(Roger Von Oech)

Só um sentido de invenção e uma necessidade
intensa de criar levam o homem a revoltar-se, a
descobrir e a descobrir-se com lucidez.
(Pablo Picasso)

RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL), *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus sakei*, estão entre as principais bactérias deteriorantes dos produtos cárneos refrigerados, embalados a vácuo e em atmosfera modificada e o conhecimento da cinética de crescimento, considerando a variação da temperatura, das culturas puras e da cultura mista dessas três BAL, possibilitam uma simulação das possíveis condições de contaminação que ocorrem nos produtos cárneos. O objetivo deste trabalho foi modelar o crescimento de BAL em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo, em meio de cultura. Para a construção das curvas de crescimento das BAL foi estudada a associação dos métodos de plaqueamento e medidas de absorbância. Foram realizados testes com *L. plantarum*, referentes à influência de cinco diferentes concentrações de inóculo (de 10^3 a 10^7 UFC.mL⁻¹) sobre a fase lag (λ), a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e o aumento logarítmico da população (A). O parâmetro λ foi o único influenciado pelo nível do inóculo, quando foi utilizado o método de absorbância, pois o seu limiar de detecção é de 10^6 - 10^7 UFC.mL⁻¹. Para evitar o efeito observado sobre o λ foi utilizado um modelo de correlação entre os valores de absorbância e contagem por plaqueamento para converter a leitura de absorbância em UFC.mL⁻¹ quando necessário. Esta associação de métodos foi validada com dados experimentais, possibilitando a obtenção de curvas de crescimento de BAL de forma confiável e menos trabalhosa. Utilizando-se o modelo de correlação definido, o crescimento isotérmico das culturas puras das BAL em meio de cultivo foi avaliado às temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C e concentração inicial de inóculo de 10^3 UFC.mL⁻¹. Os modelos de Baranyi e Roberts (BAR) e Gompertz (GO) foram ajustados às curvas de crescimento das três BAL e o modelo de BAR apresentou o melhor ajuste, sendo escolhido para determinar λ , $\mu_{\text{máx}}$ e população máxima atingida ($N_{\text{máx}}$) das três BAL. Os modelos da raiz quadrada e tipo Arrhenius descreveram a influência da temperatura sobre $\mu_{\text{máx}}$ e $N_{\text{máx}}$ das três BAL. O modelo da potência descreveu a influência da temperatura sobre λ para *L. plantarum* e as demais bactérias não apresentaram fase lag. Em seguida, duas culturas mistas (CM) foram estudadas, CM 1 composta pela mistura das cepas das três BAL e avaliada nas temperaturas de 20 e 30 °C, e CM 2 composta pela mistura das cepas de *W. viridescens* e *L. sakei* e avaliada na temperatura de 30 °C. As curvas de crescimento de CM 1 e CM 2 foram construídas utilizando o método de contagem por

plaqueamento em função do tempo e concentração inicial de inóculo de 10^3 UFC.mL⁻¹. Os modelos de BAR e GO foram ajustados às curvas de crescimento de CM 1 e CM 2 e o modelo de BAR apresentou um ajuste ligeiramente melhor para estas duas culturas mistas nas duas temperaturas de incubação estudadas, sendo escolhido para a definição de λ , $\mu_{\text{máx}}$ e $N_{\text{máx}}$ destas culturas. A variação da temperatura de incubação e o tipo de cultura mista utilizados influenciaram λ e $\mu_{\text{máx}}$, mas não foi observada alteração no $N_{\text{máx}}$. Estes resultados geraram a hipótese de que a retirada de *L. plantarum* da CM 2 poderia ter provocado estas alterações em λ e $\mu_{\text{máx}}$. No entanto, a influência de *L. plantarum* no crescimento das outras duas bactérias não pode ser identificada pelo método de plaqueamento ou pelo método de medidas de absorbância, devido ao fato destas possuírem a mesma morfologia e com isso apresentam resultados idênticos quando são quantificadas pelos métodos convencionais. A partir disto, a técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) surge como uma alternativa para quantificar e diferenciar, individualmente, a cinética de crescimento de cada uma das BAL presentes na cultura mista. Contudo, não foi possível quantificar as BAL estudadas pela técnica de qPCR, pois não houve o tempo necessário para otimizar a técnica de acordo com as exigências deste trabalho. Finalizando, foram realizados cultivos não isotérmicos de *L. plantarum* e da CM 1 a fim de estudar o comportamento das BAL numa variação de temperatura. As curvas de crescimento não isotérmico foram construídas utilizando o método de contagem por plaqueamento em função do tempo. A predição do crescimento não isotérmico de *L. plantarum*, utilizando os modelos BAR e GO, foi desenvolvida para os perfis de temperatura crescente de 12 até 20 °C e decrescente de 20 até 12 °C. Já a predição do crescimento não isotérmico da CM 1, utilizando os modelos BAR e GO, foi desenvolvida para o perfil de temperatura decrescente de 30 até 20 °C. O modelo não isotérmico de BAR apresentou melhor capacidade preditiva para os dois perfis de temperatura de *L. plantarum* e para o perfil de temperatura da CM 1 estudados. Na validação do crescimento não isotérmico da CM 1 evidenciou-se a possibilidade de duas espécies de BAL (*W. viridescens* e *L. sakei*) estarem predominando na cultura mista. A investigação desta hipótese poderia ser realizada através da técnica de qPCR. De acordo com todos os resultados apresentados, o crescimento das BAL foi fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento e os modelos obtidos permitiram prever o crescimento destas bactérias dentro da faixa de temperatura testada.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, deterioração, vida útil, produtos cárneos, cultura mista.

ABSTRACT

The lactic acid bacteria (LAB), *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* and *Lactobacillus sakei*, are among the main spoilage bacteria of chilled meat products packaged in vacuum and modified atmosphere as well as the knowledge of the growth kinetics considering the variation of the temperature, pure cultures and mixed cultures of these three LAB enable a simulation of the possible conditions of contamination occurring in meat products. The objective of this study was to model the growth of LAB in pure culture and mixed under isothermal and non-isothermal conditions of cultivation in the culture medium. For the construction of the growth curves of LAB, the association of plate count methods and absorbance measurements was studied. Tests were carried out with *L. plantarum*, referring to the influence of five different inoculum concentrations (10^3 - 10^7 CFU.mL⁻¹) on the lag phase (λ), the maximum specific growth rate (μ_{\max}) and the logarithmic increase in population (A). The parameter λ was the only influenced by the inoculum level when it was used the absorbance method because their detection threshold is 10^6 - 10^7 CFU.mL⁻¹. To prevent the observed effect on λ , we used a model of correlation between the absorbance measurements and plate count methods for converting the absorbance measurements for CFU.mL⁻¹ when necessary. This combination of methods has been validated with experimental data, making it possible to obtain growth curves of LAB reliable and less burdensome way. Using the defined correlation model, the isothermal growth of pure cultures of LAB in culture medium was evaluated at temperatures of 4, 8, 12, 16, 20 and 30 °C and initial inoculum concentration 10^3 CFU.mL⁻¹. The Baranyi and Roberts (BAR) and Gompertz (GO) models were adjusted to the growth curves of the three LAB and the BAR model showed the best fit, being chosen to determine λ , μ_{\max} and maximum population (N_{\max}) of the three LAB. The models of the square root and Arrhenius type described the influence of temperature on μ_{\max} and N_{\max} the three LAB. The model power described the influence of temperature on λ to *L. plantarum* and other bacteria showed no lag phase. Then, two mixed cultures (CM) were studied, CM 1 composed of the mixture of the three strains LAB and evaluated in the 20 and 30 °C, and CM 2 composed of the mixture of strains *W. viridescens* and *L. sakei* and evaluated the temperature 30 °C. Growth curves CM 1 and CM 2 were constructed using plate count method a function of time and initial inoculum concentration of 10^3 CFU.mL⁻¹. BAR and GO models were adjusted to the growth curves CM 1 and CM 2 and BAR model

showed a slightly better fit for these two mixed cultures at both incubation temperatures studied, being chosen for the definition of λ , μ_{\max} and N_{\max} these cultures. The variation of incubation temperature and the type of mixed culture influenced λ used and μ_{\max} , but no change was observed in N_{\max} . These results led to the hypothesis that the removal of *L. plantarum* CM 2 could have caused these changes in λ and μ_{\max} . However, the influence on the growth of *L. plantarum* bacteria of the other two cannot be identified by the plate count method or absorbance measurements due to the fact that these have the same morphology and therefore have identical results when quantified by the conventional methods. From this, the reaction technique of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) is an alternative for quantifying and differentiating individually, the growth kinetics of each LAB present in the mixed culture. However, it was not possible to quantify the LAB analyzed by qPCR, since there was not enough time, necessary to optimize the technique, according to the requirements of this study. Finally, non-isothermal growth were performed *L. plantarum* and CM 1 in order to study the behavior of BAL in a temperature range. The growth curves were constructed using non-isothermal plate count method a function of time. The prediction of the non-isothermal growth of *L. plantarum*, using the BAR and GO models, was developed for increasing temperature profile of 12 to 20 °C and decreasing to 20 to 12 °C. Since the prediction of growth of non-isothermal CM 1, using the BAR and GO model, was developed for the decreasing temperature profile of 30 to 20 °C. The non-isothermal BAR model showed better predictive ability for the two *L. plantarum* temperature profiles and the temperature profile of the CM 1 studied. Validation of non-isothermal growth of CM 1 showed the possibility of the two species of LAB (*W. viridescens* and *L. sakei*) being predominating in the mixed culture. The investigation of this hypothesis could be performed by qPCR technique. According to all presented results, the growth of LAB was strongly influenced by storage temperature and the obtained models enabled to predict growth of these bacteria within the tested temperature range.

Keywords: lactic acid bacteria, spoilage, shelf life, meat products, mixed culture.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Curva de crescimento microbiano $\ln N$ (UFC.mL ⁻¹) em função do tempo (h) com a descrição dos parâmetros de crescimento duração da fase lag (λ [h]), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ [h ⁻¹]) e aumento logarítmico da população (A). | 41 |
| Figura 2 - Curva de crescimento microbiano com a descrição dos quatro parâmetros utilizados no modelo de Baranyi e Roberts (1994)..... | 43 |
| Figura 3 - Descrição gráfica dos parâmetros de crescimento do modelo primário de Gompertz. | 45 |
| Figura 4 - Comparação da quantificação de oito microrganismos deteriorantes presentes em dez amostras de alimentos utilizando o método de contagem de células viáveis e o método molecular de PCR quantitativo (qPCR)..... | 54 |
| Figura 5 - Descrição do ciclo de temperatura da qPCR com suas respectivas etapas de desnaturação (1), anelamento (2) e extensão (3) das moléculas de DNA. | 57 |
| Figura 6 - Definição dos parâmetros de crescimento na rotina computacional feita no <i>software</i> MATLAB® R2010a versão 7.10..... | 65 |
| Figura 7 - Ajuste do modelo de BAR às curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 30 °C com diferentes níveis de inóculo, nas concentrações de 10 ³ UFC.mL ⁻¹ (a), 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹ (b), 10 ⁵ UFC.mL ⁻¹ (c), 10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ (d) e 10 ⁷ UFC.mL ⁻¹ (e). | 68 |
| Figura 8 - Valores dos parâmetros de crescimento calculados utilizando o método de medidas de absorbância e diferentes níveis de inóculo (\ln UFC.mL ⁻¹) de <i>L. plantarum</i> a 30 °C. (●) duração da fase lag (λ [h]) (a), (▲) velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ [h ⁻¹]) (b) e (■) aumento logarítmico da população (A) (c)..... | 69 |
| Figura 9 - Curvas de correlação entre \ln Absorbância <i>versus</i> \ln da contagem de células viáveis para <i>L. plantarum</i> (●) (a), <i>W. viridescens</i> (▲) (b) e <i>L. sakei</i> (■) (c) na temperatura de 30 °C. | 73 |
| Figura 10 - Dados experimentais de medidas de Abs (◆) (convertidos pelo modelo de correlação) e contagem de células viáveis (■) de uma curva de crescimento de <i>L. plantarum</i> (a), <i>L. viridescens</i> (b) e <i>L. sakei</i> (c) a 30 °C com concentração inicial de inóculo 10 ³ UFC.mL ⁻¹ | 75 |
| Figura 11 - Correlação entre os dados de absorbância (\ln abs) e os dados de contagem de células viáveis ($\ln N$) de <i>L. plantarum</i> (a), <i>W. viridescens</i> (b) e <i>L. sakei</i> (c) nas temperaturas de crescimento testadas (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C). A linha contínua representa a correlação na temperatura de 30 °C da Figura 9..... | 77 |

| | |
|--|-----|
| Figura 12 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> (a), <i>W. viridescens</i> (b) e <i>L. sakei</i> (c) em diferentes temperaturas. | 90 |
| Figura 13 - Modelos secundários que descrevem o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento (\blacklozenge) λ (a), (\bullet) $\mu_{\text{máx}}$ (b) e (\blacktriangle) $N_{\text{máx}}$ (c) para <i>L. plantarum</i> . A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado. | 94 |
| Figura 14 - Modelos secundários que descrevem o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento (\bullet) $\mu_{\text{máx}}$ (a) e (\blacktriangle) $N_{\text{máx}}$ (b) para <i>W. viridescens</i> . A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado. | 95 |
| Figura 15 - Modelos secundários que descrevem o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento (\bullet) $\mu_{\text{máx}}$ (a) e (\blacktriangle) $N_{\text{máx}}$ (b) para <i>L. sakei</i> . A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado. | 96 |
| Figura 16 - Acompanhamento da variação do pH ao longo do crescimento de <i>L. plantarum</i> (a), <i>W. viridescens</i> (b) e <i>L. sakei</i> (c) nas diferentes temperaturas de incubação. | 98 |
| Figura 17 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento da CM1 e CM2 em diferentes temperaturas. | 107 |
| Figura 18 - Comparação do crescimento das culturas puras de <i>L. plantarum</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> com o crescimento da CM 1 e da CM 2 (símbolos) na temperatura de incubação de 30 °C, incluindo o ajuste do modelo de BAR (linha contínua). | 108 |
| Figura 19 - Fluxograma das etapas de caracterização, detecção e quantificação das BAL através do uso de técnicas moleculares. | 114 |
| Figura 20 - Demonstração da direção da sequência (5' - 3') para a formação da cadeia de DNA. | 119 |
| Figura 21 - Representação das amplificações do DNA, extraído pelo método 1, das duplicatas de <i>L. plantarum</i> (a), <i>W. viridescens</i> (b) e <i>L. sakei</i> (c) com seus respectivos iniciadores. | 125 |
| Figura 22 - Avaliação da especificidade dos pares de iniciadores plnEFFw - plnEFrev (a), PRBA63F - Wsla-179-R (b) e SaKF - SaKR (c), utilizando o DNA do inóculo de cada uma das BAL, extraído pelo método 2. O número 1, 2 e 3 representam as amplificações das duplicatas de <i>L. plantarum</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> , respectivamente. | 127 |
| Figura 23 - Amplificação do DNA das diluições de <i>L. plantarum</i> utilizando o par de iniciadores plnEFFw e plnEFrev nas temperaturas de anelamento de 53 °C (a1 e a2), 54 °C (b1 e b2) e 55 °C (c1 e c2). | 130 |
| Figura 24 - Amplificação do DNA das diluições de <i>L. plantarum</i> (a), <i>W. viridescens</i> (b) e <i>L. sakei</i> (c) com seus respectivos iniciadores. | 131 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25 - Amplificação das diluições do DNA do inóculo de <i>L. plantarum</i> utilizando o par de iniciadores plnEFfw e plnEFrev. | 137 |
| Figura 26 - Amplificação do DNA dos inóculos de <i>L. plantarum</i> (a), <i>W. viridescens</i> (b) e <i>L. sakei</i> (c) utilizando o par de iniciadores SaKF e SaKR nas temperaturas de anelamento de 48 °C, 49 °C, 51 °C e 52 °C. | 138 |
| Figura 27 - Validações dos modelos não isotérmicos de BAR e GO para o perfil de temperatura com variação crescente de 12 até 20 °C de <i>L. plantarum</i> | 145 |
| Figura 28 - Validações dos modelos não isotérmicos de BAR e GO para o perfil de temperatura com variação decrescente de 20 até 12 °C de <i>L. plantarum</i> | 147 |
| Figura 29 - Validações dos modelos não isotérmicos de BAR (—) e GO (—) para o perfil de temperatura (30-20 °C) da cultura mista utilizando os ajustes dos modelos primários e secundários de <i>L. plantarum</i> (a,b), <i>W. viridescens</i> (c,d) e <i>L. sakei</i> (e,f). A linha pontilhada (....) representa o perfil de temperatura e os símbolos (●) representam os dados experimentais não isotérmicos. | 150 |
| Figura 30 – Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 30 °C..... | 184 |
| Figura 31 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 20 °C..... | 184 |
| Figura 32 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 16 °C..... | 185 |
| Figura 33 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 12 °C..... | 185 |
| Figura 34 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 8 °C..... | 186 |
| Figura 35 – Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> a 30 °C..... | 186 |
| Figura 36 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> a 20 °C..... | 187 |
| Figura 37 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados | |

| | |
|---|-----|
| experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> a 16 °C..... | 187 |
| Figura 38 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> a 12 °C..... | 188 |
| Figura 39 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> a 8 °C..... | 188 |
| Figura 40 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> a 4 °C..... | 189 |
| Figura 41 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. sakei</i> a 30 °C. | 189 |
| Figura 42 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. sakei</i> a 20 °C. | 190 |
| Figura 43 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. sakei</i> a 16 °C. | 190 |
| Figura 44 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. sakei</i> a 12 °C. | 191 |
| Figura 45 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. sakei</i> a 8 °C. | 191 |
| Figura 46 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de <i>L. sakei</i> a 4 °C. | 192 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Comparação dos índices estatísticos calculados para os modelos primários de BAR e GO ajustados às curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> a 30 °C utilizando diferentes níveis de inóculo (10^3 a 10^7 UFC.mL ⁻¹)..... | 67 |
| Tabela 2 - Parâmetros de crescimento de <i>L. plantarum</i> obtidos a partir de dados de contagem total calculados através do modelo primário de Baranyi e Roberts..... | 71 |
| Tabela 3 - Valores dos índices MSE, R ² , fator bias e fator de exatidão para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts e o modelo de Gompertz às curvas de crescimento isotérmico de <i>L. plantarum</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> às temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C..... | 88 |
| Tabela 4 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de BAR para <i>L. plantarum</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> nas diferentes temperaturas de cultivo..... | 89 |
| Tabela 5 - Equações dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento (λ , μ e $N_{\text{máx}}$) de <i>L. plantarum</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> | 93 |
| Tabela 6 - Comparação dos índices estatísticos calculados para os modelos primários de BAR e GO ajustados às curvas de crescimento da CM 1 e CM 2 nas temperaturas de incubação de 20 e 30 °C..... | 106 |
| Tabela 7 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts às curvas de crescimento de culturas mistas (CM 1 e CM 2) nas temperaturas de 20 e 30 °C..... | 107 |
| Tabela 8 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts às curvas de crescimento das culturas puras das três BAL e culturas mistas (CM 1 e CM 2) na temperatura de 30 °C..... | 109 |
| Tabela 9 - Informações gerais sobre os pares de iniciadores que foram utilizados para as três BAL presentes na cultura mista..... | 118 |
| Tabela 10 - Comparação dos índices estatísticos dos modelos não isotérmicos de BAR e GO avaliados para os dois perfis de temperatura (12-20 e 20-12 °C) para <i>L. plantarum</i> | 144 |
| Tabela 11 - Comparação dos índices estatísticos dos modelos não isotérmicos de BAR e GO avaliados para o perfil não isotérmico (30-20 °C) da cultura mista..... | 149 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μ – Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
- $\mu_{m\acute{a}x}$ – Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
- μL – Microlitro
- A – Aumento logarítmico da população
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- A(t) – Função de ajuste do modelo de BAR
- a_w – Atividade de água
- b – Coeficiente de regressão
- B – Velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M [h^{-1}]
- BAL – Bactérias ácido lácticas
- BAR – Modelo de Baranyi e Roberts
- C – Parâmetro empírico equivalente ao logaritmo natural da contagem microbiana inicial [$UFC.mL^{-1}$]
- $^{\circ}C$ – Grau Celsius
- CM 1 – Cultura mista 1
- CM 2 – Cultura mista 2
- DNA – Desoxirribonucleic acid ou ácido desoxirribonucleico
- e – igual a 2,7182
- E_a – Energia de ativação ($kJ mol^{-1}$)
- EDTA – Ethylenediaminetetraaceticacid
- GO – Modelo de Gompertz
- L – Litro
- $\ln N$ – Logaritmo natural da contagem microbiana [$UFC.mL^{-1}$]
- m – Fator de curvatura
- M – Tempo requerido para alcançar a velocidade de crescimento máxima (h)
- mL – Mililitro
- MRS – Man, Rogosa e Sharpe
- MSE – Erro médio quadrático
- n – Número de pontos experimentais
- N_0 – População bacteriana inicial ($UFC.mL^{-1}$)
- $N_{m\acute{a}x}$ – População máxima atingida ($UFC.mL^{-1}$)
- p – Número de parâmetros do modelo
- p – Parâmetro de interesse a ser modelado
- PCR – Polimerase chain reaction ou reação em cadeia da polimerase
- pH – Potencial hidrogeniônico
- q_0 – Estado fisiológico inicial da célula
- Q_0 – Estado fisiológico inicial das células

Q(t) – Estado fisiológico das células
R – Constante universal dos gases ($\text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
 R^2 – Coeficiente de correlação
RMSE – Raiz do erro médio quadrático
RSS – Soma do quadrado dos resíduos
SQRL - Soma quadrática da regressão linear
SQTc – Soma quadrática do total corrigido
t – Tempo (h)
T – Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Taq – *Thermus aquaticus*
 T_{\min} – Temperatura teórica mínima para o crescimento ($^{\circ}\text{C}$)
UFC – Unidade formadora de colônia
VU – Tempo para que a concentração de BAL atinja 10^7 UFC.mL^{-1}
 y_0 – Logaritmo natural da contagem bacteriana inicial [UFC.mL^{-1}]
 $y(t)$ – Logaritmo natural da contagem microbiana [UFC.mL^{-1}] no tempo
t [h]
 y_{\max} – Logaritmo natural da contagem microbiana máxima [UFC.mL^{-1}]
Y(t) – Razão logarítmica entre a contagem microbiana [UFC.mL^{-1}] no
tempo t [h]
 λ – Fase lag (h)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| PARTE 1 – INTRODUÇÃO..... | 29 |
| 1.1 OBJETIVOS | 31 |
| 1.1.1 Objetivo geral..... | 31 |
| 1.1.2 Objetivos específicos..... | 31 |
| PARTE 2 - REVISÃO DA LITERATURA..... | 35 |
| 2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS..... | 35 |
| 2.1.1 Deterioração de produtos cárneos | 36 |
| 2.2 MICROBIOLOGIA PREDITIVA | 38 |
| 2.2.1 Modelos preditivos..... | 40 |
| 2.2.2 Modelos primários de crescimento..... | 42 |
| 2.2.2.1 Modelo de Baranyi e Roberts..... | 42 |
| 2.2.2.2 Modelo de Gompertz..... | 44 |
| 2.2.3 Modelos secundários..... | 45 |
| 2.3 MÉTODOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO..... | 46 |
| 2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO NOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS .. | 48 |
| 2.5 MODELOS NÃO ISOTÉRMICOS – MODELOS DINÂMICOS.. | 49 |
| 2.6 CAPACIDADE DE PREDIÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS | 51 |
| 2.7 CULTURA MISTA..... | 52 |
| 2.7.1 PCR quantitativo (qPCR)..... | 55 |
| PARTE 3 - CAPÍTULOS DA TESE..... | 60 |
| CAPÍTULO 1..... | 61 |
| 1 ASSOCIAÇÃO DE MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS..... | 61 |
| 1.1 MATERIAL E MÉTODOS | 62 |
| 1.1.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)..... | 62 |
| 1.1.2 Preparo do inóculo | 62 |
| 1.1.3 Avaliação da influência da concentração de inóculo sobre o crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i> | 62 |
| 1.1.4 Aplicação de modelos primários da literatura | 63 |
| 1.1.5 Comparação dos modelos primários | 65 |
| 1.1.6 Associação do método direto e indireto para a construção das curvas de crescimento de BAL..... | 65 |
| 1.1.7 Validação do modelo de correlação entre método direto e indireto para a obtenção das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> | 66 |

| | |
|---|------------|
| 1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 67 |
| 1.2.1 Avaliação da influência da concentração de inóculo sobre o crescimento de <i>L. plantarum</i> | 67 |
| 1.2.2 Obtenção do modelo de correlação entre o método de absorbância e plaqueamento | 72 |
| 1.2.3 Validação do modelo de correlação entre os métodos direto e indireto para a obtenção das curvas de crescimento de <i>L. plantarum</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>L. sakei</i> | 76 |
| 1.3 CONCLUSÕES PARCIAIS | 79 |
| 1.4 REFERÊNCIAS..... | 79 |
| CAPÍTULO 2 | 84 |
| 2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE CULTURAS PURAS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Weissella viridescens</i> E <i>Lactobacillus sakei</i> EM CALDO MRS SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS..... | 84 |
| 2.1 MATERIAL E MÉTODOS | 84 |
| 2.1.1 Bactérias..... | 84 |
| 2.1.2 Preparo do inóculo | 84 |
| 2.1.3 Condições de crescimento..... | 85 |
| 2.1.4 Amostragem..... | 85 |
| 2.1.5 Modelo de correlação..... | 85 |
| 2.1.6 Modelos primários de crescimento | 86 |
| 2.1.7 Modelos secundários..... | 86 |
| 2.1.8 Comparação estatística dos modelos..... | 87 |
| 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 87 |
| 2.2.1 Ajuste dos modelos primários às curvas de crescimento das BAL | 87 |
| 2.2.2 Modelos secundários..... | 92 |
| 2.2.3 pH das BAL | 97 |
| 2.3 CONCLUSÕES PARCIAIS | 99 |
| 2.4 REFERÊNCIAS..... | 99 |
| CAPÍTULO 3 | 103 |
| 3 MODELAGEM DA CULTURA MISTA DAS BAL <i>L. plantarum</i>, <i>W. viridescens</i> E <i>L. sakei</i>..... | 103 |
| 3.1 MATERIAL E MÉTODOS | 103 |
| 3.1.1 Bactérias..... | 103 |
| 3.1.2 Preparo do inóculo | 103 |
| 3.1.3 Condições de crescimento da cultura mista | 103 |
| 3.1.4 Amostragem da cultura mista para plaqueamento e absorbância | 104 |
| 3.1.5 Modelagem do crescimento da cultura mista..... | 104 |
| 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 105 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.1 Ajuste dos modelos primários às curvas de crescimento isotérmico das culturas mistas..... | 105 |
| 3.3 CONCLUSÕES PARCIAIS | 110 |
| 3.4 REFERÊNCIAS..... | 110 |
| CAPÍTULO 4..... | 113 |
| 4 USO DA TÉCNICA DE qPCR NA CARACTERIZAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS BAL <i>L. plantarum</i>, <i>W. viridescens</i> E <i>L. sakei</i>..... | 113 |
| 4.1 MATERIAL E MÉTODOS | 113 |
| 4.1.1 Bactérias..... | 113 |
| 4.1.2 Preparo do inóculo | 113 |
| 4.1.3 Coleta de amostras e aplicação das técnicas moleculares | 113 |
| 4.1.4 Etapas do Fluxograma..... | 115 |
| 4.1.4.1 Extração do DNA..... | 115 |
| 4.1.4.2 Teste inicial de amplificação utilizando iniciador universal de bactérias..... | 116 |
| 4.1.4.3 Seleção dos iniciadores | 118 |
| 4.1.4.4 Avaliação da especificidade dos iniciadores – PCR convencional | 119 |
| 4.1.4.5 PCR quantitativo (qPCR) - Avaliação da especificidade dos iniciadores | 120 |
| 4.1.4.6 Testes da temperatura de anelamento – <i>L. plantarum</i> | 121 |
| 4.1.4.7 Construção da curva padrão das BAL..... | 122 |
| 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 122 |
| 4.2.1 PCR convencional..... | 122 |
| 4.2.1.1 Amplificação do DNA das BAL..... | 122 |
| 4.2.2 PCR quantitativo (qPCR)..... | 123 |
| 4.2.2.1 Especificidade dos iniciadores de cada BAL | 123 |
| 4.2.2.2 Investigação da temperatura de anelamento do par de iniciadores plnEFfw e plnEFrev na amplificação de <i>L. plantarum</i> | 129 |
| 4.2.2.3 Curva padrão das BAL..... | 131 |
| 4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS | 132 |
| 4.4 REFERÊNCIAS..... | 133 |
| 4.5 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES..... | 137 |
| CAPÍTULO 5..... | 140 |
| 5 MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus plantarum</i> E DA CULTURA MISTA DAS TRÊS BAL EM MEIO DE CULTIVO SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS..... | 140 |
| 5.1 MATERIAL E MÉTODOS | 140 |
| 5.1.1 Bactérias ácido lácticas | 140 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.2 Preparo do inóculo | 141 |
| 5.1.3 Condições de crescimento não isotérmico | 141 |
| 5.1.4 Construção das curvas de crescimento..... | 141 |
| 5.1.5 Predição do crescimento de <i>L. plantarum</i> e da cultura mista em condições não isotérmicas..... | 142 |
| 5.1.6 Otimização numérica do modelo não isotérmico | 142 |
| 5.1.7 Validação do modelo não isotérmico | 142 |
| 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 143 |
| 5.2.1 Crescimento não isotérmico de <i>L. plantarum</i> | 143 |
| 5.2.2 Crescimento não isotérmico da cultura mista | 148 |
| 5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS | 151 |
| 5.4 REFERÊNCIAS..... | 152 |
| PARTE 4 – CONCLUSÃO FINAL | 155 |
| PARTE 5 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 157 |
| PARTE 6 - REFERÊNCIAS | 158 |
| APÊNDICE..... | 184 |
| APÊNDICE 1 – Curvas de crescimento isotérmico de <i>L. plantarum</i> (Lp), <i>W. viridescens</i> (Ws) e <i>L. sakei</i> (Ls) nas diferentes temperaturas de incubação testadas | 184 |
| ANEXO..... | 194 |
| ANEXO I - Meios de Cultura e reagentes utilizados | 194 |

PARTE 1 – INTRODUÇÃO

Diversos estudos relatam as bactérias ácido lácticas (BAL) como sendo os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (SAKALA et al., 2002; FADDA et al., 2008; NYCHAS et al., 2008; LI et al., 2013), destacando-se algumas bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella* como por exemplo *Lactobacillus sakei*, *Weissella viridescens*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus curvatus* (DOULGERAKI et al., 2012; DALCANTON et al., 2013).

De acordo com a necessidade de controlar o crescimento destes microrganismos deteriorantes, estuda-se a cinética do crescimento das BAL que pode prever a duração da vida útil dos alimentos através da microbiologia preditiva (McMEEKIN et al., 2008). A microbiologia preditiva é uma ferramenta que utiliza modelos preditivos para descrever o comportamento microbiano. O crescimento microbiano é caracterizado por uma curva sigmoide que apresenta três fases distintas: fase lag, fase exponencial e fase estacionária. Sendo que, estas fases são descritas pelos parâmetros de crescimento microbiano obtidos pelo ajuste dos modelos preditivos às curvas de crescimento microbiano.

A duração da fase lag (λ) é um parâmetro de crescimento microbiano que está relacionado com a vida útil dos alimentos e a estimativa deste torna-se cada vez mais importante na microbiologia preditiva (LONGHI et al., 2013). Esta fase pode ser influenciada por fatores como: condições ambientais, tipo e estado fisiológico das bactérias, nível do inóculo, entre outros fatores (SWINNEN et al., 2004). Os demais parâmetros que descrevem o crescimento microbiano são a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), o aumento logarítmico da população (A) e a população máxima atingida ($N_{\text{máx}}$).

Existem diversos modelos preditivos que podem descrever as curvas de crescimento microbiano (McKELLAR e LU, 2004; BRUL; VAN GERWEN; ZWIETERING, 2007), no entanto é importante selecionar corretamente o tipo de modelagem adequada para cada caso a ser analisado. Os modelos primários descrevem a variação de um determinado evento, como por exemplo, a concentração dos microrganismos em função do tempo. Os modelos secundários são equações matemáticas que descrevem o comportamento dos parâmetros de crescimento, obtidos pelo ajuste dos modelos primários, em função da variação dos fatores intrínsecos (pH, atividade de água, composição do alimento) ou extrínsecos (temperatura, atmosfera da embalagem, umidade) (KOUTSOUMANIS et al., 2006; JUNEJA et al., 2009).

As curvas de crescimento microbiano podem ser construídas através do uso de métodos que quantificam indiretamente a concentração celular, como método de medida de absorvância, e métodos que quantificam diretamente a concentração microbiana, como o método de contagem por plaqueamento. A escolha do método para a construção das curvas de crescimento microbiano depende dos objetivos e estratégias adotadas no estudo do microrganismo de interesse.

Dentre os diversos fatores que influenciam na deterioração dos alimentos, a temperatura é um dos mais importantes (FRANCO e LANDGRAF, 2008), e estudos relacionados com temperaturas flutuantes e abusos de temperatura mostram uma realidade mais próxima com o que ocorre com os alimentos durante o armazenamento e distribuição (BRÉAND et al., 1997). O uso de modelos não isotérmicos, para prever o comportamento microbiano em condições variáveis de temperatura, pode ser uma alternativa para compreender as alterações ocorridas durante a cadeia de produção dos alimentos refrigerados, como os produtos cárneos.

A microbiota natural dos alimentos é composta por vários tipos de microrganismos, sendo identificada como uma cultura mista, e quando se tem o interesse de estudar a vida útil dos alimentos torna-se importante investigar a carga microbiana responsável pela deterioração dos mesmos. Os produtos cárneos apresentam normalmente uma carga inicial de BAL em torno de 10 UFC.g^{-1} (KOUTSOUMANIS et al., 2008) e o limite microbiológico para BAL estabelecido como o final da vida útil de produtos refrigerados à base de carne é de 10^7 UFC.g^{-1} de acordo com Slongo et al. (2009) e Dalcanton et al. (2013), pois não há registros, até o momento, na legislação para as BAL como microrganismos deteriorantes.

Para simular as condições reais que acontecem nos alimentos cárneos que podem ser deteriorados pelas BAL, é necessário estudar as curvas de crescimento de culturas mistas contendo as linhagens de BAL geralmente encontradas nestes alimentos como: *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus sakei*, já que na literatura somente são encontrados trabalhos que investigam o comportamento de algumas linhagens de BAL, em culturas mistas, na presença de microrganismos patogênicos.

A caracterização, detecção e quantificação de cada uma das BAL, presentes na cultura mista, pela utilização dos métodos de medida de absorvância e contagem por plaqueamento não são possíveis devido ao fato destas apresentarem a mesma morfologia, apresentando resultados idênticos frente a estas análises. Em virtude disto, o uso de técnicas

moleculares, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) pode ser utilizada como uma alternativa promissora que, além de quantificar as bactérias presentes na cultura mista, é capaz de diferenciá-las, permitindo a construção das curvas de crescimento de cada cepa participante da cultura, individualmente (SINGH et al, 2009). O crescimento em cultura pura e mista poderá, desta forma, ser comparado. Portanto, a técnica de qPCR pode representar uma excelente alternativa para a quantificação de microrganismos, como será abordado neste trabalho.

A identificação dos microrganismos através de métodos moleculares de quantificação é largamente utilizada em trabalhos referentes a caracterização fenotípica (taxonômica) destes indivíduos. No entanto, a utilização destas técnicas para a construção de curvas de crescimento microbiano vem sendo desenvolvido recentemente em alguns trabalhos presentes na literatura.

O estudo da modelagem do crescimento das culturas puras e cultura mista das BAL em meio de cultivo apresenta fatores que podem ser controlados mais facilmente do que as matrizes alimentares, com isso os resultados que serão apresentados nesta tese são úteis para estimar o comportamento destas bactérias quando presentes em alimentos. Este assunto é promissor e de grande interesse para as indústrias processadoras de carnes e derivados, pois investiga algumas possibilidades para controlar o desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis, como os deteriorantes, nos alimentos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi modelar o crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista, sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo, em meio de cultura padrão.

1.1.2 Objetivos específicos

- Definir a metodologia para o acompanhamento das curvas de crescimento de BAL de forma rápida e segura;
- Modelar o crescimento de *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus sakei* em condições isotérmicas de cultivo pelo ajuste e comparação de diferentes modelos

- primários;
- Selecionar o modelo secundário que melhor descreva o efeito da temperatura sobre os parâmetros primários de crescimento (duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e população bacteriana máxima ($N_{\text{máx}}$) obtidos a partir do modelo primário selecionado;
 - Estabelecer metodologia para contagem de BAL em cultura mista através do uso da técnica de qPCR;
 - Modelar as curvas de crescimento das BAL em cultura mista sob condições isotérmicas;
 - Predição do crescimento de *L. plantarum* e da cultura mista das três BAL em condições não isotérmicas utilizando os resultados experimentais obtidos em condições isotérmicas de crescimento;
 - Avaliação da capacidade preditiva dos modelos não isotérmicos através dos dados experimentais obtidos de *L. plantarum* e da cultura mista das três BAL sob condições de temperaturas variáveis.

1.2 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO

O laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC tem desenvolvido trabalhos de pesquisa na área de Microbiologia Preditiva sob orientação da Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão. Esta linha de pesquisa teve início em 2003 e envolve alunos de graduação e pós-graduação através de trabalhos de iniciação científica, dissertações e teses, sendo um grupo de pesquisa pioneiro nesta área em Santa Catarina. No grupo, foram defendidas até o momento nove dissertações de mestrado e seis teses de doutorado.

As bactérias ácido lácticas são importantes no estudo da deterioração de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, o que justifica o interesse do grupo de pesquisa na modelagem do crescimento destas bactérias com quatro dissertações de mestrado e três teses de doutorado defendidas até o momento relacionadas com este tema. Alguns destes trabalhos avaliaram a modelagem do crescimento microbiano em produtos cárneos e em culturas puras em meio de cultivo partindo de uma concentração inicial de inóculo elevada (10^7 UFC.mL⁻¹). Com isso, ocorreu a necessidade de estudar a modelagem do crescimento das culturas puras de *Lactobacillus plantarum*, *Weissella* [*Lactobacillus*] *viridescens* e *Lactobacillus sakei*

partindo de uma concentração inicial de inóculo baixa (10^3 UFC.mL⁻¹), já que os produtos cárneos apresentam uma carga inicial de BAL normalmente em torno de 10 UFC.g⁻¹, e das culturas mistas contendo estas três BAL a fim de simular as condições reais de contaminação que ocorrem nestes alimentos.

PARTE 2 - REVISÃO DA LITERATURA

A seguir serão abordados alguns assuntos de interesse para esta pesquisa referente à importância do estudo das bactérias ácido lácticas (BAL) como deteriorantes de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, microbiologia preditiva, modelagem matemática, construção das curvas de crescimento das BAL, cultura mista e biologia molecular.

2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão presentes em pequenas quantidades na microflora inicial de alimentos como carnes, vegetais, leite, produtos lácteos, molhos para saladas, frutos do mar entre outros (DOULGERAKI et al., 2010; SLONGO et al., 2009; COSTA, 2013; DALCANTON et al., 2013; DOROTA et al., 2014; MANIOS; LAMBERT; SKANDAMIS, 2014). Este grupo de bactérias incluem os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY, 2005).

As BAL apresentam características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e bioquímicas comuns podendo ser classificadas como Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativas, apresentam-se na forma de cocos ou bacilos, microaerófilas e anaeróbicas facultativas. São geralmente mesófilas, pois tem a temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 35 °C, no entanto conseguem se desenvolver numa ampla faixa de temperatura entre 5 °C e 45 °C (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; AXELSSON, 2004; MASSAGUER, 2006).

Estas bactérias toleram com facilidade baixos valores de pH e possuem metabolismo estritamente fermentativo, podendo ser classificadas como homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com o produto final da fermentação que é originado. As bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como produto final da fermentação e nesta classificação estão incluídos os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*. Já as heterofermentativas produzem ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e etanol, com isso são responsáveis pelo desenvolvimento da acidez dos produtos e também pelo aparecimento de aromas e sabores específicos. As bactérias classificadas como heterofermentativas são: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* e *Lactosphaera*.

Os *Lactobacillus* apresentam-se tanto na forma homofermentativa quanto na heterofermentativa (LYHS, 2002; JAY, 2005; MASSAGUER, 2006).

As BAL são de grande importância para os produtos cárneos refrigerados, embalados a vácuo ou em atmosfera modificada sendo consideradas como microrganismos específicos de deterioração destes alimentos (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; HUGAS, 1998; SAKALA et al., 2002; FADDA et al., 2008; NYCHAS et al., 2008; LI et al., 2013). Mesmo que apresentem a capacidade de produzir bacteriocinas, as BAL ainda necessitam de uma atenção com relação à sua capacidade de deteriorar os alimentos. Os principais aspectos que caracterizam a deterioração da carne devido à produção de metabólitos são: mudanças na textura, aparência e sabor do produto, produção de odores indesejáveis e formação de um líquido com aspecto leitoso na superfície do produto, chamado de limo por alguns autores (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; SAMELIS; KAKOUI; REMENTZIS, 2000; CAYRÉ; VIGNOLO; GARRO, 2003; NYCHAS et al., 2008).

2.1.1 Deterioração de produtos cárneos

A deterioração da carne e produtos cárneos durante o processamento, distribuição, armazenamento e venda para o consumidor é um assunto de grande interesse na literatura (NYCHAS et al., 2008). O controle da qualidade das carnes e produtos cárneos deve concentrar-se no monitoramento dos pontos críticos durante o ciclo de vida da carne, desde o momento do abate até a chegada do produto para o consumidor final. Por ser considerado um alimento altamente perecível, a carne necessita de um controle bem detalhado dos fatores que podem causar sua deterioração. Dentre os fatores intrínsecos (pH, a_w , composição do alimento, interações entre os microrganismos) e extrínsecos (temperatura, atmosfera da embalagem, umidade), a temperatura é um dos fatores mais associados com a deterioração dos produtos cárneos (KOUTSOUMANIS et al., 2006; JUNEJA et al., 2009). Com isso, o controle das condições de tempo e temperatura durante todo o processamento da carne é de suma importância para a segurança e qualidade destes alimentos (NYCHAS et al., 2008).

O monitoramento da temperatura de armazenamento dos alimentos contribui para o controle da multiplicação dos microrganismos deteriorantes, como as BAL, e patogênicos. De acordo com a Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999), os produtos cárneos devem ser armazenados

numa faixa de temperatura entre 0 °C e 10 °C, mas essa não é a realidade que acontece na cadeia do frio de produtos refrigerados. Os abusos de temperatura colaboram com a diminuição do tempo de vida útil destes produtos, e a refrigeração inadequada dos alimentos ainda é um fator que ocasiona intoxicação alimentar, mesmo com tantos estudos e recomendações sobre o manuseio dos alimentos refrigerados e suas temperaturas de armazenamento ideais (KENNEDY et al., 2005; JAMES; EVANS; JAMES, 2008; JEVSNIK; HLEBEC; RASPOR, 2008; LAGUERRE e FLICK, 2010).

A carga microbiana existente na carne após o abate vai depender, além das condições fisiológicas do animal, da contaminação cruzada que poderá ocorrer no momento do abate. Muitos dos microrganismos existentes nas carcaças e superfície da carne são oriundos das condições inadequadas proporcionadas pelos manipuladores e a deterioração da carne após o processamento normalmente está associada à concentração microbiana inicial existente (CAYRÉ; VIGNOLO; GARRO, 2003; KOUTSOUMANIS e SOFOS, 2004; NYCHAS; MARSHALL; SOFOS, 2007).

Com o intuito de aumentar a vida útil dos alimentos cárneos, surgiram as embalagens com atmosfera modificada ou embalagens a vácuo. Estes processos tecnológicos de preservação dos alimentos baseiam-se no princípio de manter o alimento num ambiente sem a presença de oxigênio, favorável para o controle do desenvolvimento microbiano, ação enzimática e a oxidação dos alimentos, como no caso das embalagens a vácuo; ou manter o alimento envolvido por uma atmosfera contendo uma mistura de gases como oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂) e nitrogênio (N₂). Esta estratégia baseia-se na utilização de concentrações menores de O₂ e concentrações maiores de CO₂, a fim de retardar o crescimento dos microrganismos deteriorantes e patogênicos presentes nos alimentos (MANTILLA et al., 2010).

Dentre as diversas particularidades das embalagens utilizadas para a conservação dos alimentos e de acordo com a conservação das características originais do produto, a embalagem a vácuo não altera o sabor dos alimentos, porém a carne fica mais escura. Isto ocorre devido à ausência de oxigênio proporcionada pela atmosfera da embalagem. Este ambiente limita o crescimento de algumas bactérias deteriorantes como *Pseudomonas* spp. porém, permite o crescimento de outros microrganismos como as BAL, que podem causar a deterioração destes alimentos (SAKALA et al., 2002; FADDA et al., 2008; LI et al., 2013).

A microflora natural das carnes e produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada é composta por *Lactobacillus* spp.,

geralmente *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*, *Leuconostoc* spp. como *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* e *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella* [*Lactobacillus*] *viridescens*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromicus* e *Brochothrix thermosphacta* (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; GUERRERO e CHABELA, 2000; VERMEIREN; DEVLIEGHIERE; DEBEVERE, 2004). *L. plantarum* é responsável por originar produtos com acidez excessiva, característica que é considerada indesejável para o consumo humano (GARRIGA et al., 1993). Esta espécie pode ser considerada predominante em diversos produtos cárneos embalados a vácuo (CHENOLL et al., 2007). *W. viridescens* ocorrem em diferentes tipos de ambientes como, por exemplo, em vegetais, legumes, mandioca e silagem (WANG e NISHINO, 2008), bem como em carnes e produtos cárneos (PATTERSON et al., 2010; HAN et al., 2011; COMI e IACUMIN, 2012; DOULGERAKI et al., 2012). Dušková, Kameník e Karpíšková (2013) relatam que as bactérias do gênero *Weissella* não recebem atenção suficiente, porém são importantes deteriorantes de produtos cárneos. *L. sakei* é uma BAL presente na microbiota das carnes e produtos cárneos, podendo ser considerada como bactéria predominante dos produtos cárneos armazenados sob temperaturas de refrigeração (CHAILLOU et al., 2005; ERCOLINI et al., 2006; CHENOLL et al., 2007; ERCOLINI et al., 2009). Doulgeraki et al. (2010) verificaram que a presença de *L. sakei* prevaleceu nas amostras de carne moída armazenadas na temperatura de 0 °C, bem como nas amostras com ou sem óleo essencial de orégano nas temperaturas de armazenamento de 0 e 5 °C.

2.2 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

Cada vez mais as indústrias de alimentos buscam por técnicas que permitam prever e monitorar a deterioração dos alimentos para estimar a vida útil dos mesmos. A microbiologia preditiva é uma ferramenta que vem sendo largamente utilizada para a determinação da vida útil dos alimentos, através do uso de equações matemáticas, que descrevem a cinética microbiana definindo os níveis de deterioração dos alimentos (KOUTSOUMANIS e NYCHAS, 2000; MATARAGAS et al., 2006). Os modelos originados através da aplicação da microbiologia preditiva podem ser utilizados no auxílio da interpretação dos problemas ocasionados durante o processamento, distribuição e armazenamento dos alimentos, permitindo definir qual ou quais microrganismos são responsáveis pela deterioração do alimento em estudo (McMEEKIN et

al., 1997).

A origem dos modelos preditivos para alimentos é sugerida por alguns autores como sendo em 1922 quando Esty e Meyer descreveram um processamento térmico, através de um modelo linear, suficiente para destruir os esporos de *Clostridium botulinum* tipo A (ROSS, 1996). No entanto, o primeiro conceito de microbiologia preditiva foi dado por Scott em 1937 e devido às condições oferecidas na época, a abordagem desta nova sub-disciplina da microbiologia dos alimentos ficaria só no papel. Com o desenvolvimento de inovações tecnológicas, a partir da década de 1960, tornou-se possível a aplicação de todas as teorias e conceitos da microbiologia preditiva (McMEEKIN et al., 2008).

O conceito de microbiologia preditiva baseia-se no desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevem a cinética de crescimento e inativação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, presentes nos alimentos, em função de condições ambientais constantes e/ou variáveis (GEERAERD et al., 2004; VAN IMPE et al., 2005).

Na microbiologia preditiva, os modelos matemáticos que apresentam um bom desempenho devem fornecer valores seguros dos parâmetros de crescimento calculados. A veracidade na determinação destes parâmetros de crescimento é alcançada de acordo com o método de construção da curva de crescimento microbiano escolhido (KANDHAI et al., 2006). A capacidade dos modelos matemáticos em prever o crescimento dos microrganismos em um novo ambiente, pelo uso de dados experimentais observados no passado, gera um crescente interesse na investigação e uso da microbiologia preditiva (ANTWI et al., 2008).

A maioria dos modelos desenvolvidos são baseados em condições *in vitro* geradas em laboratórios, onde os microrganismos são monitorados em função das variações de temperatura, pH, a_w , entre outros. A partir disto, os modelos desenvolvidos podem ser aplicados em matrizes alimentares (WILSON et al., 2002).

Existe uma grande quantidade e variedade de modelos preditivos que podem descrever as curvas de crescimento microbiano isotérmico (McMEEKIN et al., 1993; McKELLAR e LU, 2004; BRUL; VAN GERWEN; ZWIETERING, 2007), sendo que, estes modelos vêm sendo aplicados com bastante frequência na avaliação do crescimento de diferentes microrganismos (WENG; WU; LEI, 2012; LI et al., 2013; LOBACZ; KOWALIK; TARCZYNSKA, 2013; YE et al., 2013).

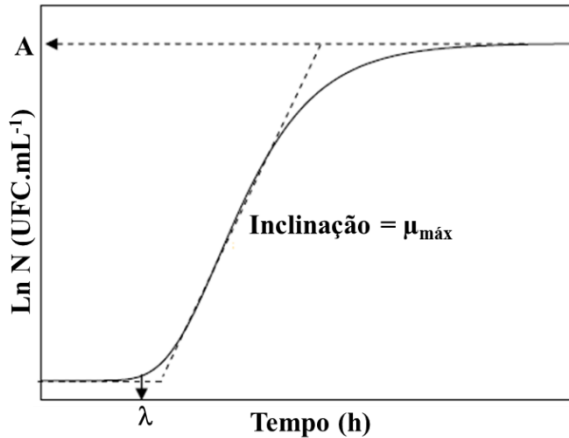
2.2.1 Modelos preditivos

Os modelos preditivos são divididos em duas categorias: mecanísticos ou teóricos e empíricos ou fenomenológicos. Os modelos mecanísticos descrevem a cinética microbiana por meio de um embasamento teórico e os modelos empíricos fazem esta descrição através de equações matemáticas que se ajustam com maior facilidade à fisiologia microbiana (FERRER et al., 2009). Por isso, os modelos empíricos são mais utilizados do que os modelos mecanísticos (McMEEKIN et al., 2002), e eles podem ser classificados em modelos cinéticos e modelos probabilísticos.

Os modelos cinéticos estudam o comportamento dos microrganismos através das características de crescimento, inativação, velocidade específica de crescimento em função do tempo, e os modelos probabilísticos estudam a probabilidade da ocorrência de um evento em um período de tempo, como por exemplo, a produção de toxinas (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000). Os modelos cinéticos são muito utilizados para descrever o comportamento de microrganismos deteriorantes de alimentos como as bactérias ácido lácticas.

As curvas de crescimento no formato sigmoidal (Figura 1) são comumente descritas nos trabalhos que abordam microbiologia preditiva (SMITH-SIMPSON et al., 2007; MYTILINAIOS et al., 2012; LI et al., 2013; LONGHI et al., 2013), sendo elas divididas em três fases: fase lag (λ), fase exponencial ($\mu_{\text{máx}}$) e fase estacionária de crescimento (A) (BARANYI e PIN, 1999).

Figura 1 - Curva de crescimento microbiano $\ln N$ (UFC.mL⁻¹) em função do tempo (h) com a descrição dos parâmetros de crescimento duração da fase lag (λ [h]), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ [h⁻¹]) e aumento logarítmico da população (A).



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

A duração da fase lag (λ) é um parâmetro de crescimento microbiano que está relacionado com a vida útil dos alimentos e a estimativa deste torna-se cada vez mais importante na microbiologia preditiva (LONGHI et al., 2013). Esta fase é considerada como a adaptação do microrganismo ao novo ambiente e pode ser influenciada por fatores como: condições ambientais, tipo e estado fisiológico das bactérias, nível do inóculo, entre outros fatores (SWINNEN et al., 2004). Os demais parâmetros que descrevem o crescimento microbiano são a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e o aumento logarítmico da população (A). Para a obtenção destes parâmetros de crescimento microbiano, são ajustados modelos matemáticos às curvas de crescimento.

Os principais parâmetros avaliados durante o crescimento microbiano são a fase lag e a velocidade específica de crescimento (RASCH et al., 2007), porém alguns autores concordam que destes dois parâmetros estudados, a fase lag apresenta uma maior complexidade tanto na sua interpretação quanto na sua determinação (BUCHANAN e PHILIPS, 1990; BARANYI e ROBERTS, 1994; AUGUSTIN e CARLIER, 2000).

De acordo com o estudo da modelagem da cinética microbiana, os modelos preditivos são classificados em três níveis: primário, secundário

e terciário. Esta classificação foi desenvolvida primeiramente por Davey em 1992 sendo aprimorada por Whiting e Buchanan (1993). Os modelos primários descrevem a variação de determinado evento, como por exemplo, a concentração dos microrganismos em função do tempo. Os modelos secundários são equações matemáticas que descrevem o comportamento dos parâmetros de crescimento, definidos pelos modelos primários, em função das variações das condições ambientais (temperatura, pH, a_w , entre outras). Os modelos terciários são aplicações de modelos primários e secundários em *softwares* computacionais que facilitam a modelagem das curvas de crescimento em um determinado produto sob diferentes condições específicas.

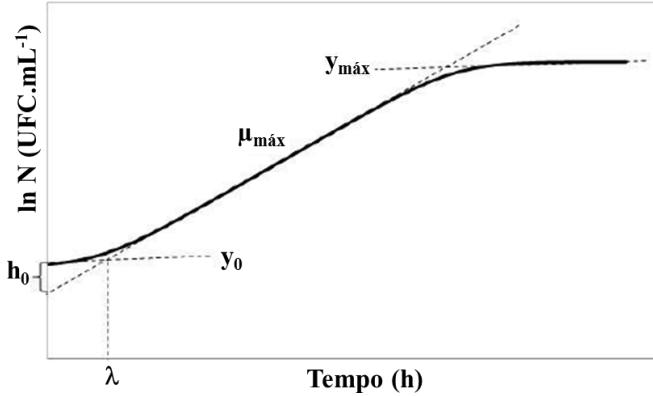
2.2.2 Modelos primários de crescimento

2.2.2.1 Modelo de Baranyi e Roberts

O modelo de Baranyi e Roberts (BAR) é um dos modelos primários de crescimento mais utilizados na microbiologia preditiva (BARANYI e ROBERTS, 1994; VAN IMPE et al., 2005; SMITH-SIMPSON et al., 2007). Entre as razões existentes para o uso deste modelo tem-se a sua boa capacidade de ajuste e os parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis. Este modelo introduz um conceito de estado fisiológico das células definido pelo parâmetro h_0 (BARANYI e ROBERTS, 1994; FERRER et al., 2009).

O estado fisiológico das células (h_0) é definido como o produto da fase lag com a velocidade específica máxima de crescimento. Muitos autores consideram que o estado fisiológico das células tem relação tanto com as condições de incubação quanto com as condições de crescimento nas quais o microrganismo é submetido, concluindo que a análise do mesmo é muito importante no estudo da vida útil dos alimentos (AUGUSTIN; ROSSO; CARLIER, 2000; PIN et al., 2002; SWINNEN et al., 2004; LONGHI, 2012). A definição dos seus parâmetros de crescimento (y_0 , $y_{m\acute{a}x}$, $\mu_{m\acute{a}x}$ e h_0) pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2 - Curva de crescimento microbiano com a descrição dos quatro parâmetros utilizados no modelo de Baranyi e Roberts (1994).



Fonte: Singh (2010).

A Equação 1 descreve o modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994) e na Equação 2 está representada a função de ajuste deste modelo.

$$y(t) = y_0 + \mu_{máx} \cdot A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m \cdot \mu_{máx} \cdot A(t)} - 1}{e^{m(y_{máx} - y_0)}} \right) \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{máx}} \ln \left(\frac{q_0 + e^{(-\mu_{máx} \cdot t)}}{1 + q_0} \right) \quad (2)$$

onde $y(t)$ é a concentração celular [UFC.mL⁻¹] no tempo t [h], y_0 é a concentração celular inicial [UFC.mL⁻¹], $\mu_{máx}$ é a velocidade específica máxima de crescimento [h⁻¹], $y_{máx}$ é a concentração celular máxima [UFC.mL⁻¹], m é um fator de curvatura, $A(t)$ representa a função de ajuste e q_0 é o estado fisiológico inicial da célula.

O parâmetro m não melhora de forma significativa a qualidade dos ajustes em muitos casos, com isso pode ser considerado igual a um. Além disso, é necessária a transformação do parâmetro q_0 , descrito na Equação 2, no parâmetro h_0 através da Equação 3 para que o ajuste do modelo aos dados experimentais torne-se mais estável (BARANYI e ROBERTS, 1994, LONGHI, 2012).

$$h_0 = \ln\left(1 + \frac{1}{q_0}\right) \quad (3)$$

Através da substituição da Equação 3 na Equação 2, uma nova função de ajuste poderá ser definida, como descrito na Equação 4.

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln\left(e^{(-\mu_{m\acute{a}x} \cdot t)} + e^{(-h_0)} - e^{[(-\mu_{m\acute{a}x} \cdot t) - h_0]}\right) \quad (4)$$

E a duração da fase lag (λ [h]) é definida pela Equação 5.

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

2.2.2.2 Modelo de Gompertz

O modelo de Gompertz (GO) (Equação 6) é um modelo primário que vem sendo amplamente utilizado para descrever a cinética microbiana (GIBSON; BRATCHELL; ROBERTS, 1987; McKELLAR e LU, 2004; BRUCKNER et al., 2013).

$$\ln N = C + A \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (6)$$

A velocidade específica de crescimento (μ [h⁻¹]) e a duração da fase lag (λ [h]) podem ser calculadas segundo as Equações 7 e 8.

$$\mu = \frac{A \cdot B}{e} \quad (7)$$

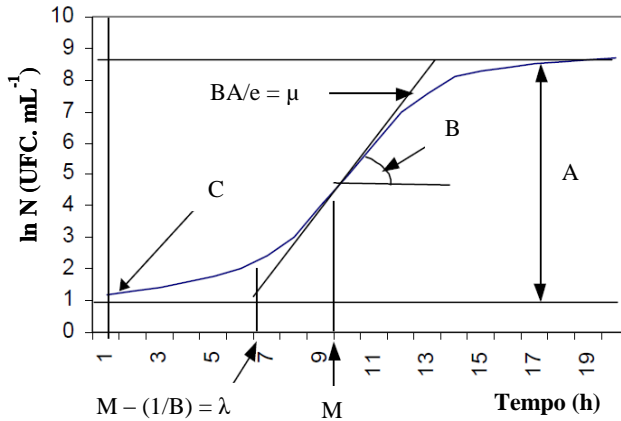
$$\lambda = M - \frac{1}{B} \quad (8)$$

onde $\ln N$ é o logaritmo natural da contagem microbiana [UFC.mL⁻¹] no tempo t [h], C é um parâmetro empírico equivalente ao

logaritmo natural da contagem microbiana inicial [$\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$], A é o aumento logarítmico da população, B é a velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M [h^{-1}], e é igual a 2,7182 e M é o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento [h].

A Figura 3 apresenta os parâmetros de crescimento descritos pelo modelo primário de Gompertz.

Figura 3 - Descrição gráfica dos parâmetros de crescimento do modelo primário de Gompertz.



Fonte: Adaptado de Nakashima, André e Franco (2000).

Nos estudos de Li et al. (2013), quando compararam o crescimento das BAL em carne crua embalada a vácuo nas temperaturas de 7, 10, 15 e 20 °C pelo ajuste dos modelos de Gompertz, Logístico, Baranyi e Roberts e Modelo de Huang, verificaram que apesar dos parâmetros de crescimento determinados pelos modelos primários de crescimento testados não terem apresentado diferenças significativas, o modelo de Gompertz apresentou valores ligeiramente superiores para a fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento quando comparados com os outros modelos primários testados.

2.2.3 Modelos secundários

Os modelos secundários baseiam-se na descrição de fatores como, temperatura, pH e a_w nos parâmetros de crescimento duração da fase lag (λ), velocidade específica de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população (A) (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000; McMEEKIN

e ROSS, 2002; MARKS, 2008; HUANG; HWANG; PHILLIPS, 2011).

O bom desempenho de um modelo secundário está relacionado com a eficiência deste de gerar bons resultados quando são utilizados os valores gerados na região de interpolação, por exemplo, quando se estuda o comportamento da velocidade específica de crescimento (μ) de um determinado microrganismo nas temperaturas de 11, 25 e 40 °C, o modelo secundário gerado deverá ser capaz de prever corretamente o parâmetro μ em quaisquer temperaturas presentes no intervalo entre 11 e 40 °C (BUCHANAN; WHITING; DAMERT, 1997; GEERAERD et al., 2004).

Dentre os diversos modelos secundários citados na literatura (McDONALD e SUN, 1999; ROSS e DALGAARD, 2004), existem os modelos clássicos que são muito utilizados nos trabalhos de microbiologia preditiva como o modelo da raiz quadrada proposto por Ratkowsky et al. (1982) e a equação do tipo Arrhenius (ROSS e DALGAARD, 2004; CORRADINI e PELEG, 2005; GOSPAVIC et al., 2008; HUANG, 2010; KREYENSCHMIDT et al., 2010; HUANG et al., 2012).

O modelo da raiz quadrada está representado pela Equação 9.

$$\sqrt{p} = b(T - T_{\min}) \quad (9)$$

onde p é o parâmetro de interesse a ser modelado (λ , μ e A), b representa o coeficiente de regressão, T é a temperatura (°C) e T_{\min} é a temperatura teórica mínima para o crescimento (°C).

A equação do tipo Arrhenius está representada pela Equação 10.

$$\ln p = a \left(\frac{1}{T} \right) + b \quad (10)$$

onde p é o parâmetro de interesse a ser modelado (λ , μ e A), T é a temperatura (°C) e a e b são parâmetros do modelo.

2.3 MÉTODOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

A escolha do método para a construção das curvas de crescimento microbiano depende diretamente dos objetivos e estratégias adotadas no estudo do microrganismo de interesse. O crescimento microbiano pode

ser avaliado por métodos que quantificam indiretamente a concentração celular, como método de medida de absorvância, e métodos que quantificam diretamente a concentração microbiana, como o método de plaqueamento.

A contagem de células viáveis por plaqueamento é um método que apresenta o limite mínimo de detecção inferior a 20 UFC.mL⁻¹. Porém, este método é considerado trabalhoso e demorado (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Já o método de medida de absorvância tem algumas vantagens como, por exemplo, de ser um método rápido, barato e tem a capacidade de monitorar muitas amostras simultaneamente, porém apresenta um limiar de detecção de 10⁶-10⁷ UFC.mL⁻¹ (KOCH, 1994).

O uso do método de medidas de absorvância para a construção das curvas de crescimento microbiano utilizadas na microbiologia preditiva é amplamente empregado por ser um método rápido, barato e gerar uma grande quantidade de dados (CHEROUTRE-VIALETTE et al., 1998; NERBRINK et al., 1999; VASSEUR et al., 1999; DALGAARD e KOUTSOUMANIS, 2001) sendo possível determinar a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) a partir das curvas de crescimento microbiano construídas (DALGAARD et al., 1994; BARANYI e PIN, 1999; DALGAARD e KOUTSOUMANIS, 2001; BIESTA-PETERS et al., 2010). No entanto, a determinação da fase lag (λ) utilizando este método não é eficiente devido a alguns fatores como concentração inicial do inóculo e pelo fato que o método não detecta concentrações celulares baixas devido ao seu limite de detecção, podendo gerar uma falsa fase lag nas curvas de crescimento (BIESTA-PETERS et al., 2011). Com isso, a busca por soluções alternativas e práticas que resultem numa estimativa eficiente dos parâmetros de crescimento deve ser investigada.

Vários modelos de correlação entre as medidas de absorvância e a contagem de células viáveis são relatados por diversos autores, como por exemplo, o uso de modelos baseados na lei de Lambert-Beer, obtidos a partir de culturas puras de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* em carne moída (JORGENSEN e SCHULZ, 1985), BAL, *Brochothrix thermosphacta* e *Pseudomonas* spp. em carne crua e produtos cárneos processados (SCHULZ; JENSEN; CELERYNOVA, 1988), diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* em meio de cultivo (BEGOT et al., 1996), e *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* em vegetais crus (LACK et al., 1999); o uso de modelos polinomiais de segunda ordem obtidos a partir do crescimento de *Listeria monocytogenes* utilizando diferentes combinações de temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio (NaCl) (McCLURE et al., 1993); o uso

de modelos polinomiais de terceira ordem no crescimento de *Salmonella* (STEPHENS et al., 1997) e modelos com transformações logarítmicas no crescimento de *Pseudomonas fragi* (HUDSON e MOTT, 1994), *Bacillus cereus* (CHORIN et al., 1997), *Lactococcus lactis* (FRANCOIS et al., 2003) e *Listeria monocytogenes* (FRANCOIS et al., 2005). Combinações entre as medidas de absorbância com os dados de contagem de células viáveis, a fim de construir as curvas de crescimento dos microrganismos, também foram sugeridas por outros autores a fim de estimar os parâmetros de crescimento microbiano (BRÉAND et al., 1997; STEPHENS et al., 1997; AUGUSTIN; ROSSO; CARLIER, 1999).

Para a utilização desta associação de métodos na microbiologia preditiva é necessário que ocorra uma relação entre a turbidez das amostras com a concentração celular ao longo da curva de crescimento, sendo que, a obtenção de bons parâmetros de crescimento pelo ajuste de um modelo matemático, vai depender da qualidade dos dados fornecidos pelo modelo de correlação utilizado entre os métodos de contagem bacteriana para a construção da curva de crescimento (FRANCOIS et al., 2005).

2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO NOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

Na microbiologia preditiva são utilizadas altas concentrações de inóculo para estudar e avaliar os modelos matemáticos, devido ao fato de que altas concentrações celulares reduzem a variabilidade dos resultados e asseguram a repetibilidade (SUTHERLAND; BAYLISS; BRAXTON et al., 1995; McKELLAR e LU, 2004). Quando estuda-se a vida útil dos alimentos é importante lembrar que estes apresentam uma concentração bacteriana inicial baixa, com isso torna-se necessário o estudo da influência do tamanho do inóculo na determinação dos parâmetros de crescimento (LLAUDES et al., 2001). Os produtos cárneos, por exemplo, apresentam uma carga inicial de BAL normalmente em torno de 10 UFC.g^{-1} e muitas vezes esta carga atinge uma população de $10^8 - 10^9 \text{ UFC.g}^{-1}$ na fase estacionária de crescimento bacteriano e o limite microbiológico estabelecido para o final da vida útil de produtos refrigerados à base de carne é de 10^7 UFC.g^{-1} (LLAUDES et al., 2001; KOUTSOUMANIS et al., 2008; SLOGO et al., 2009).

A variação no tamanho do inóculo é considerada um dos fatores que podem causar alteração nos parâmetros de crescimento dos microrganismos. Estas alterações são observadas principalmente na

duração da fase lag (BARANYI e PIN, 1999; AUGUSTIN et al., 2000). Estudos sobre o crescimento microbiano, sob condições ambientais fixas, relatam que a velocidade específica de crescimento não é afetada quando ocorre apenas a variação da concentração inicial do inóculo (CUPPERS e SMELT, 1993; ZHAO; MONTIVILLE; SCHAFFNER, 2000).

Alguns trabalhos verificaram o quanto a variação da concentração inicial do inóculo pode interferir nos parâmetros de crescimento das culturas puras. Kaprelyants e Kell (1996) afirmaram que a duração da fase lag é inversamente proporcional ao tamanho do inóculo em alguns casos; Augustin et al. (2000) observaram que a duração da fase lag de *Listeria monocytogenes* também é afetada pelos diferentes tamanhos de inóculo; Robinson et al. (2001) observaram que a variação no tamanho do inóculo não influencia a velocidade específica máxima de crescimento de *Listeria monocytogenes*, porém a duração da fase lag é influenciada por esta variação; e Zhao, Montiville e Schaffner (2000) verificaram que, variando apenas o nível inicial do inóculo de *Clostridium botulinum* 56A, a velocidade específica de crescimento não é afetada.

Embora existam diversos estudos que comprovem a influência da concentração do inóculo no crescimento microbiano (RAZAVILAR e GENIGEORGIS, 1998; MASANA e BARANYI, 2000; ROBINSON et al., 2001; PASCUAL et al., 2001; KOUTSOUMANIS e SOFOS, 2005), ainda é necessária uma investigação mais cautelosa com relação a todos os fatores que influenciam este fenômeno.

2.5 MODELOS NÃO ISOTÉRMICOS – MODELOS DINÂMICOS

Os produtos cárneos devem ser armazenados numa faixa de temperatura entre 0 °C e 10 °C (BRASIL, 1999) para uma boa conservação. No entanto, as variações e abusos de temperaturas sofridas durante o armazenamento e manuseio podem afetar de maneira crítica a qualidade destes alimentos (KOUTSOUMANIS e TAOUKIS, 2005; KOUTSOUMANIS et al., 2006; McMEEKIN et al., 2006).

Inúmeros fatores ambientais podem causar alterações na cinética microbiana, sendo que a temperatura é considerada um dos fatores ambientais mais importantes no que diz respeito a avaliação do crescimento microbiano. Alguns estudos relacionados com a variação de temperaturas durante o armazenamento dos alimentos, mostram uma realidade mais próxima com o que ocorre com os alimentos no dia a dia (BRÉAND et al., 1997).

Baseando-se nos modelos primários e nos modelos secundários que são ajustados às curvas de crescimento microbiano pode-se

estabelecer um modelo não isotérmico. Dentre os diversos modelos não isotérmicos que são utilizados para a predição do crescimento microbiano tem-se o modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994) e o modelo não isotérmico de Gompertz (VAN IMPE et al., 1992).

As Equações diferenciais 11 e 12 representam o modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994).

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left[\frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right] \{1 - \exp[y(t) - y_{m\acute{a}x}]\} \quad (11)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \quad (12)$$

onde $y(t)$ é logaritmo natural da contagem microbiana N no tempo t , ou seja, $y(t) = \ln[N(t)]$; $Q(t)$ é a função de ajuste, considerada como o estado fisiológico das células (BARANYI e ROBERTS, 1994), $\mu_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade específica máxima de crescimento e $y_{m\acute{a}x}$ é o logaritmo natural da contagem microbiana máxima.

As Equações 13 e 14 descrevem as condições iniciais utilizadas para resolver as Equações diferenciais 11 e 12.

$$y(0) = y_0 \quad (13)$$

$$Q(0) = Q_0 \quad (14)$$

onde y_0 representa o logaritmo natural da contagem bacteriana inicial N_0 , ou seja, $y(0) = \ln[N_0]$; Q_0 é considerado como o valor do estado fisiológico inicial das células que relaciona-se com o parâmetro h_0 através da Equação 15. Esta relação permite que se obtenha um ajuste mais estável do modelo partindo de uma transformação do h_0 no parâmetro Q_0 .

$$Q_0 = -\ln[\exp(h_0) - 1] \quad (15)$$

A Equação diferencial 16 representa o modelo de Gompertz utilizado para prever o crescimento microbiano em condições não isotérmicas (VAN IMPE et al., 1992).

$$\frac{dY(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{\exp(1)}{A} \right) \left[\ln \left(\frac{A}{Y(t)} \right) \right] Y(t) \quad (16)$$

onde $Y(t)$ é a razão logarítmica entre a contagem microbiana N no tempo t e a contagem inicial N_0 , ou seja, $(Y(t) = \ln[N/N_0])$, $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade específica máxima de crescimento e A é o aumento logarítmico da população que corresponde à razão logarítmica entre a contagem microbiana máxima $N_{m\acute{a}x}$ e a contagem microbiana inicial N_0 , isto é, $A = \ln[N_{m\acute{a}x}/N_0]$.

Para resolver a Equação 16, utiliza-se a condição inicial descrita pela Equação 17.

$$Y(0) = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\lambda \mu_{m\acute{a}x} \exp(1)}{A} + 1 \right] \right\} \quad (17)$$

onde tem-se os parâmetros de crescimento fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e aumento logarítmico da população (A).

2.6 CAPACIDADE DE PREDIÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS

Os índices estatísticos coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE) ou raiz do erro médio quadrado (RMSE), fator bias e fator de exatidão (ROSS, 1996) são utilizados para avaliar o desempenho dos modelos matemáticos utilizados no ajuste das curvas de crescimento microbiano.

O coeficiente de determinação (R^2) fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas (Equação 18). Os valores R^2 mais próximos de 1 são considerados os melhores (RODRIGUES e IEMMA, 2005; GEITENES et al., 2013).

$$R^2 = \frac{\sum_i \left(\hat{y}_{ij} - \bar{y} \right)^2}{\sum_i \left(y_{ij} - \bar{y} \right)^2} = \frac{SQRL}{SQTc} \quad (18)$$

onde $SQRL$ é a soma quadrática da regressão linear e $SQTc$ é a

soma quadrática do total corrigido.

O cálculo do MSE está descrito na Equação 19, onde RSS é a soma do quadrado dos resíduos, n é o número de pontos experimentais e p é o número de parâmetros do modelo. Quanto menor o valor do MSE melhor é o desempenho do modelo analisado.

$$MSE = \frac{RSS}{n - p} = \frac{\sum (valor_{observado} - valor_{predito})^2}{n - p} \quad (19)$$

O fator bias (Equação 20) é uma estimativa para avaliar a diferença média entre os valores observados e preditos pelo modelo, onde n é o número de pontos experimentais.

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{predito} / \text{Valor}_{observado})}{n} \right)} \quad (20)$$

Quando o fator bias é maior que 1, significa que o valor predito é maior que o observado, indicando que o modelo falha de forma segura, enquanto que quando o fator bias é menor que 1, significa que o valor predito é menor que o observado, indicando que o modelo falha de forma perigosa. Fator bias e fator de exatidão iguais a 1 significam que ocorre uma relação perfeita entre os valores preditos e observados (ROSS, 1996; GEITENES et al., 2013; LONGHI et al., 2013).

O fator de exatidão é a medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados, este valor é sempre maior ou igual a 1, quanto maior o seu valor, menos precisa é a média das estimativas (ROSS, 1996). A Equação 21 descreve o cálculo do fator de exatidão, onde n é o número de pontos experimentais.

$$\text{fator exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\text{Valor}_{predito} / \text{Valor}_{observado})|}{n} \right)} \quad (21)$$

2.7 CULTURA MISTA

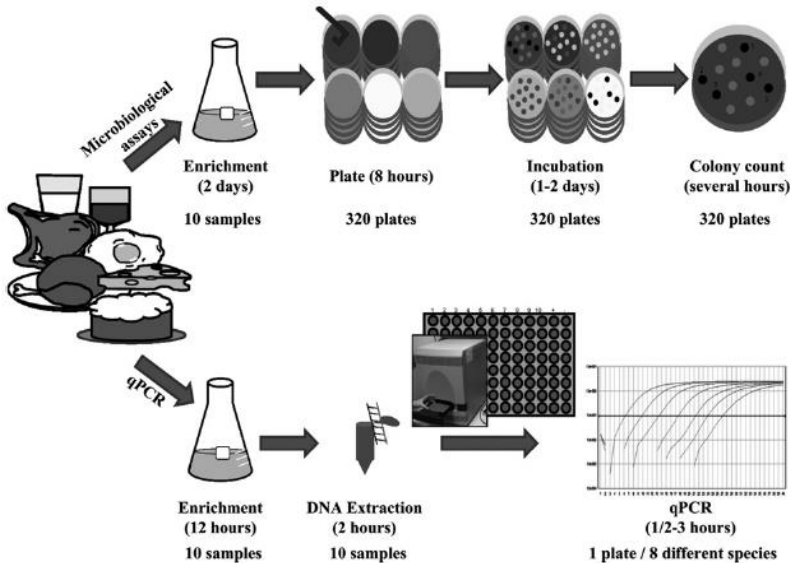
A maioria dos trabalhos presentes na literatura estudam a modelagem matemática de diversos tipos de microrganismos em cultura pura, e muitas vezes, as interações ocorridas entre os microrganismos da

microbiota natural de cada alimento (cultura mista) não são levadas em consideração (JANSSEN et al., 2006). Para simular as condições reais que ocorrem nos alimentos cárneos que podem ser deteriorados pelas BAL, surge a necessidade de estudar as curvas de crescimento de uma cultura mista contendo as três espécies de lactobacilos estudados nesta tese, *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, já que os trabalhos disponibilizados na literatura sobre este tipo de cultura são muito escassos.

As BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus* fazem parte da microflora natural de diversos alimentos como: leite, produtos lácteos, carnes, produtos cárneos, frutas e legumes. De acordo com Vandamme et al. (1996), os *Lactobacillus* não representam um gênero bem definido, possuindo assim, características genéticas bem diversificadas. Eles também apresentam semelhanças fenotípicas e fisiológicas, não possibilitando a diferenciação das cepas por técnicas convencionais, como por exemplo, contagem de células viáveis e medidas de absorbância, sendo necessário o uso de métodos moleculares para este fim.

Além disso, os métodos moleculares possibilitam que os experimentos de quantificação microbiana tenham menor tempo de duração, como mostra a Figura 4 quando compara a quantificação de oito microrganismos deteriorantes, presentes em dez amostras de alimentos, utilizando o método de contagem de células viáveis e o método molecular de PCR quantitativo (qPCR). A Figura citada indica o tempo de duração aproximado de cada método avaliado (6 dias para a contagem de células viáveis *versus* 2 dias para o método PCR quantitativo) evidenciando que o método molecular expressa os resultados de quantificação em tempo hábil quando comparado com o método de contagem por plaqueamento. Também são descritos os reagentes e os materiais utilizados (320 placas de Petri *versus* 1 placa de qPCR) em cada método (SINGH et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2011).

Figura 4 - Comparação da quantificação de oito microrganismos deteriorantes presentes em dez amostras de alimentos utilizando o método de contagem de células viáveis e o método molecular de PCR quantitativo (qPCR).



Fonte: Martínez et al. (2011).

As diversas espécies de *Lactobacillus*, aproximadamente 140 espécies (EUZÉBY, 1997), apresentam muitas semelhanças entre si e inúmeros métodos de classificação baseados em características fenotípicas e fisiológicas, além de comparações do sequenciamento genético já foram estudados (COLLINS et al., 1991; HAMMES e VOGEL, 1995; STILES e HOLZAPFEL, 1997). Comparando-se os métodos de classificação existentes, tem-se que o uso de testes bioquímicos para este tipo de comparação é considerado extremamente difícil e de custo elevado, necessitando o uso de métodos moleculares para complementar os diagnósticos, tornando-os mais confiáveis. A caracterização fenotípica não permite a diferenciação entre as espécies na cultura mista. Já os métodos moleculares apresentam muitas vantagens com relação aos métodos de plaqueamento e os testes bioquímicos, pois são considerados métodos rápidos, confiáveis e com reprodutibilidade dos dados (SINGH et al, 2009).

Vários estudos são encontrados sobre a caracterização genética do gênero *Lactobacillus* com capacidade probiótica (CHARTERIS et al., 1997; GIRAFFA e NEVIANI, 2000; McCARTNEY, 2002; COEURET et al., 2003; LICK, 2003). Nos estudos realizados por Singh et al. (2009), foi dado um enfoque para a identificação e diferenciação entre espécies muito semelhantes de BAL como: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. graminis*, *L. curvatus* e *L. sakei* pelo uso de métodos moleculares, sendo estes muito eficientes para a diferenciação entre as espécies analisadas.

Dentre os métodos moleculares existentes, a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa vem sendo amplamente utilizada para a identificação e quantificação de algumas espécies de *Lactobacillus*. Como por exemplo, na identificação de *Lactobacillus* em salsichas fermentadas (MARTÍN et al., 2006), na microbiota humana (HAARMAN e KNOL, 2006), em fezes de frango (SELIM et al., 2005), em cáries dentárias (BYUN et al., 2004), em probióticos (KAO; LIU; SHYU, 2007), detecção de BAL em produtos como cerveja e leite (HAAKENSEN et al., 2007; MARTÍN et al., 2008) e na produção de vinhos e vinagre (TORIJA; MATEO; GUILLAMON, 2010).

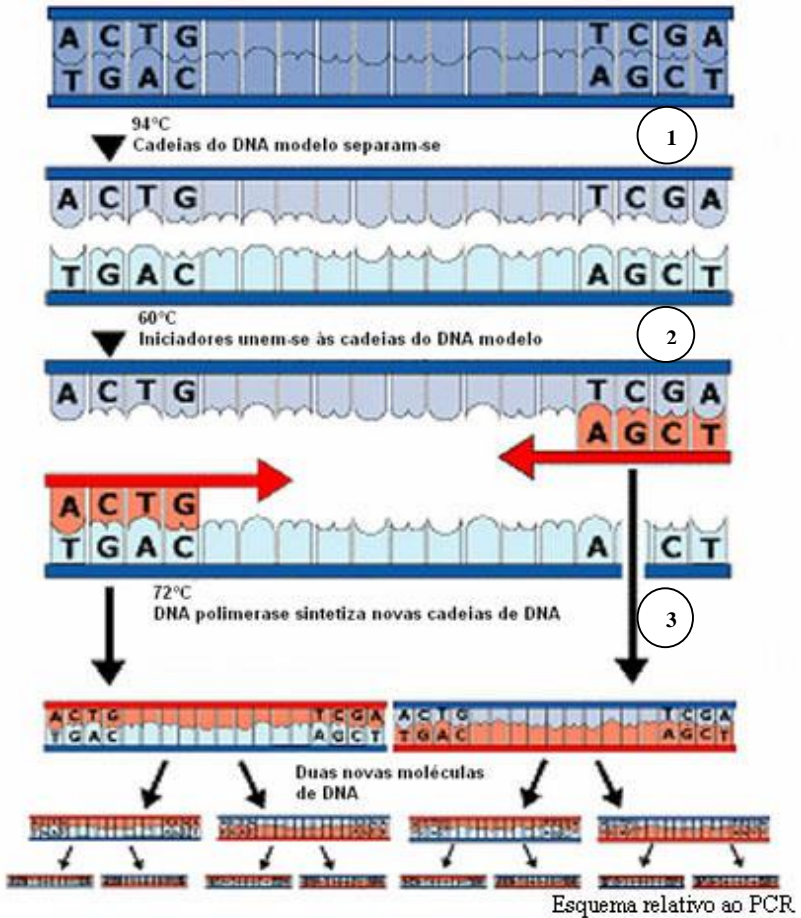
2.7.1 PCR quantitativo (qPCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi descoberta nos anos 80 pelo bioquímico Kary B. Mullis, que em 1993, recebeu o prêmio Nobel de Química devido ao grande potencial existente no trabalho que desenvolvera (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004). Existem várias técnicas na biologia molecular que englobam a PCR, uma delas é a PCR quantitativa (qPCR). A qPCR foi utilizada durante muito tempo em análises laboratoriais de diagnósticos clínicos na área médica e farmacêutica. Atualmente, esta técnica vem sendo utilizada na área de ciência e tecnologia dos alimentos, visando garantir a qualidade e segurança dos alimentos pela identificação e quantificação dos microrganismos deteriorantes e patogênicos (MAKINO; FUJIMOTO; WATANABE, 2010; MARTÍNEZ et al., 2011). Ela se baseia na amplificação de uma sequência específica de DNA inúmeras vezes, utilizando a combinação da técnica de PCR convencional com um método de detecção e quantificação do DNA microbiano por fluorescência (MARTÍNEZ et al., 2011).

A técnica apresenta três etapas que dependem da variação da temperatura. Na primeira etapa, a temperatura é elevada a 94-96 °C e ocorre a desnaturação da dupla fita do DNA através do rompimento das

pontes de hidrogênio. Em seguida, ocorre a segunda etapa de anelamento dos iniciadores com os segmentos de DNA em cadeia simples, que pode ocorrer entre as temperaturas de 57 a 63 °C. E por fim a etapa de extensão que ocorre a 72 °C, na qual a enzima Taq DNA polimerase irá sintetizar as novas moléculas de DNA originadas. A Taq DNA polimerase é uma enzima termoestável que tolera temperaturas elevadas por longos períodos de tempo permitindo que a reação da qPCR ocorra com múltiplos ciclos de síntese de DNA sem a necessidade de ser interrompido para que a enzima seja substituída. Ela é responsável pela amplificação dos fragmentos de DNA durante a reação de qPCR e auxilia na introdução dos nucleotídeos que vão complementar a cadeia que está sendo sintetizada (KUBISTA et al., 2006). Estas três etapas se repetem por 30 ou 40 ciclos para cada reação e ocorre um crescimento exponencial das moléculas de DNA resultando em um número de cópias igual a 2^n (n = número de ciclos da reação). A Figura 5 mostra o ciclo de temperatura da qPCR com suas respectivas etapas de desnaturação, anelamento e extensão das moléculas de DNA.

Figura 5 - Descrição do ciclo de temperatura da qPCR com suas respectivas etapas de desnaturação (1), anelamento (2) e extensão (3) das moléculas de DNA.



Fonte: A Biologia e os Desafios da Atualidade.

O monitoramento da técnica de qPCR ocorre em tempo real e os dados são recolhidos ao longo de toda a reação. Existem diversas maneiras para o uso da qPCR, uma delas é baseada no uso de fluoróforos que são compostos fluorescentes que têm a capacidade de se ligarem entre a fita dupla de DNA, absorvendo e emitindo luz em um comprimento de onda específico. Existem diversos tipos de compostos fluorescentes,

alguns deles são: brometo de etídio, YO-PRO-I, SYBR Green, TaqMan, SYBR Gold, BEBO, BOXTO, LCGreen e SYTO9 (LOGAN e EDWARDS, 2009). Um dos compostos mais utilizados é o SYBR Green, pois ele apresenta vantagens como baixo custo, facilidade na utilização, alta sensibilidade e apresenta maior sensibilidade de detecção quando comparado ao brometo de etídio (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

Outra particularidade existente para o uso das técnicas moleculares, como a qPCR, é a seleção dos iniciadores com especificações detalhadas sobre a espécie na qual ele será utilizado, sempre levando em consideração a temperatura de anelamento do iniciador. Os iniciadores são sequências de DNA sintetizadas nos quais apresentam uma sequência de bases nitrogenadas, que é específica do microrganismo estudado, permitindo o preenchimento das fitas. Os iniciadores podem ser universais ou grupo-específicos e a escolha destes compõe uma tarefa bem detalhada, uma vez que eles devem ter características específicas para um determinado microrganismo, mas nem sempre é isto que ocorre (FORNEY; ZHOU; BROWN, 2004). Quando são utilizados iniciadores inespecíficos para a reação de qPCR são geradas respostas erradas de quantificação dos microrganismos em estudo.

A técnica da qPCR é altamente sensível e pode ser aplicada em um grande número de amostras, e além disso apresenta inúmeras vantagens com relação ao uso da PCR convencional. Os processos de amplificação, detecção e quantificação do DNA ocorrem em uma única etapa, com redução no tempo de análise e menor risco de contaminação das amostras, pois não é feita a etapa de eletroforese na qual os tubos com as amostras são abertos e o DNA fica exposto ao ambiente. Além destas vantagens, o qPCR é um método mais preciso do que o PCR convencional (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; MACKAY, 2004; ESPY et al., 2006).

O uso de métodos moleculares em alimentos torna-se cada vez mais importante e necessário, devido ao fato de que nas matrizes alimentares existem diversas espécies de microrganismos, dificultando a quantificação e identificação das culturas mistas naturalmente presentes.

Considerando que a qPCR pode detectar e quantificar um ou mais microrganismos presentes em um meio de cultivo, conclui-se que o método pode ser aplicado tanto para a construção de curvas de crescimento microbiano em cultura pura como em culturas mistas. Portanto, esta ferramenta representa uma alternativa viável para a

quantificação de uma cultura mista que apresenta microrganismos do mesmo gênero, mas de espécies diferentes, como será abordado neste trabalho.

PARTE 3 - CAPÍTULOS DA TESE

Capítulo 1: Associação de métodos para obtenção de curvas de crescimento de bactérias ácido lácticas.

Capítulo 2: Efeito da temperatura sobre o crescimento de culturas puras de *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus sakei* em caldo MRS sob condições isotérmicas.

Capítulo 3: Modelagem da cultura mista das BAL *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*.

Capítulo 4: Uso da técnica de qPCR na caracterização, detecção e quantificação das BAL *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*.

Capítulo 5: Modelagem do crescimento de *Lactobacillus plantarum* e da cultura mista das três BAL em meio de cultivo sob condições não isotérmicas.

CAPÍTULO 1

1 ASSOCIAÇÃO DE MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

O crescimento microbiano é caracterizado por uma curva sigmoideal que apresenta três fases distintas: fase lag (λ), fase exponencial ($\mu_{\text{máx}}$) e fase estacionária (A). E a construção desta curva de crescimento pode ser feita pelo uso de métodos que quantificam indiretamente a concentração celular, como método de medida de absorbância, e métodos que quantificam diretamente a concentração microbiana, como o método de plaqueamento.

Nesta tese foram estudadas as curvas de crescimento das culturas puras de *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus sakei* em meio de cultivo com concentração inicial de inóculo de 10^3 UFC.mL⁻¹, com a necessidade de semelhar o estudo do crescimento das BAL em meio cultivo com a realidade que ocorre nos alimentos, os quais apresentam carga microbiana inicial baixa.

A construção destas curvas de crescimento, com concentração inicial de inóculo baixa, utilizando o método de medida de absorbância não é possível porque este apresenta um limiar de detecção de 10^6 - 10^7 UFC.mL⁻¹ (KOCH, 1994), para isto o método de plaqueamento poderia ser a solução, no entanto este é um método demasiadamente trabalhoso e demorado (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

De acordo com esta problemática, foi investigada, neste capítulo, a possibilidade da associação dos métodos de contagem que permita a obtenção das curvas de crescimento das BAL de forma confiável e menos trabalhosa do que o método de plaqueamento padrão. Sendo também analisada, a influência da variação do nível de inóculo (entre 10^3 UFC.mL⁻¹ a 10^7 UFC.mL⁻¹) nos parâmetros de crescimento de *L. plantarum* a 30 °C.

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Centro Tecnológico (CTC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

1.1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)

A cepa de *L. plantarum* (CCT 0580 ATCC 8014, Lote 07.05) foi estocada em microtubos de polipropileno à temperatura de $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, Le Pont de Claix, França), contendo 20 % (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). As cepas de *W. viridescens* (CCT 5843 ATCC 12706, Lote 22.06) e *L. sakei* (CCT 5841 ATCC 15521, Lote 38.08) foram adquiridas na forma liofilizada da coleção de Culturas André Tosello (Fundação Tropical de Culturas André Tosello, Campinas, Brasil). As cepas destas duas BAL foram reidratadas conforme indicação e cultivadas em caldo MRS (Anexo I). Em seguida, foram estocadas em microtubos de polipropileno com caldo MRS contendo 20 % (v/v) de glicerol à temperatura de $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior utilização.

1.1.2 Preparo do inóculo

A cepa congelada a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ em glicerol (20 %), de cada uma das BAL em estudo, foi reativada em 160 mL de caldo MRS a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa (Dist, Florianópolis, Brasil). (GARCÍA-GIMENO; MARTÍNEZ; SILÓNIZ, 2002; FRIZZO et al., 2010; DALCANTON, 2010). Após o tempo de incubação de 18 h, foi realizada a contagem de células viáveis segundo a técnica de plaqueamento por profundidade a fim de se verificar a concentração celular de cada BAL, no final do tempo de incubação. No plaqueamento, foi utilizado agar MRS (Anexo I) com dupla camada, em placas de Petri estéreis descartáveis, incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h em estufa (Dist, Florianópolis, Brasil). A contagem foi realizada a partir das placas com 30 a 300 colônias, sendo a contagem expressa em $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em todos os experimentos realizados, as três BAL encontravam-se na concentração celular máxima de $10^9\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, após o período de incubação de 18 h.

1.1.3 Avaliação da influência da concentração de inóculo sobre o crescimento de *Lactobacillus plantarum*

Para avaliar a influência da concentração de inóculo sobre o crescimento de BAL, foram realizados experimentos de crescimento apenas com a bactéria *L. plantarum*, à temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para cinco

diferentes concentrações de inóculo, entre 10^3 UFC.mL⁻¹ a 10^7 UFC.mL⁻¹. Os frascos, contendo 160 mL de caldo MRS, foram inoculados com 1 % (v/v) de inóculo de *L. plantarum* e incubados em estufa (Dist, Florianópolis, Brasil) a 30 °C e as curvas de crescimento foram acompanhadas até a fase estacionária. Para a construção das curvas de crescimento, foi utilizado o método de medida de absorbância em função do tempo. Foram coletados, assepticamente em câmara de fluxo laminar (CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil), 2 mL de caldo de cultivo para as leituras de absorbância (abs) em espectrofotômetro (Bel Photonics 1105, Monza, Itália) em intervalos de tempo preestabelecidos para cada nível de inóculo, até que fosse atingida a fase estacionária.

Nos experimentos com concentração inicial de 10^3 , 10^5 e 10^7 UFC.mL⁻¹, também foi realizado o acompanhamento do crescimento por contagem de células viáveis em função do tempo. O plaqueamento foi realizado como descrito no item 1.1.2 deste capítulo. Os experimentos foram repetidos em dias diferentes gerando duplicata de experimentos, sendo que cada dia de experimento foi conduzido com duplicata de erlenmeyers. Durante os experimentos, a temperatura mantida dentro das estufas de incubação foi registrada por um *datalogger* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha), com registro de temperatura a cada 5 minutos.

1.1.4 Aplicação de modelos primários da literatura

Os modelos primários de BAR (BARANYI e ROERTS, 1994) e GO (GIBSON; BRATCHELL; ROBERTS, 1987) foram selecionados para descrever a influência de diferentes concentrações de inóculo sobre o crescimento de *L. plantarum* na temperatura de incubação de 30 °C. As equações dos modelos de BAR e GO estão descritas no item 2.2.2 da Revisão da Literatura. O ajuste dos modelos foi feito no *software* MATLAB® R2010a versão 7.10 (MathWorks, Natick, USA) e a rotina computacional utilizada está descrita abaixo:

Exemplo:

Command Window

>> edit doze_um.txt

Abrirá uma janela de bloco de notas: Editor

Colocar no Editor os dados referentes aos valores de x e y (tempo x ln N)

Salvar o Editor e fechar esta janela

>> load doze_um.txt

Definir x e y

>> tempodoze_um = doze_um(:,1), lnNdoze_um = doze_um(:,2)

Abrirá no programa os valores definidos para x e para y

Ferramenta de ajuste

>> cftool → abrirá uma janela

Curve Fitting Tool

Data: x data → seleciona tempodoze_um

y data → seleciona lnNdoze_um

Create data set > Close

Aparecerá a curva no Curve Fitting Tool

Fitting

New Fit > Fit Name: LP 12C curva1_BAR

Data set: lndoze_um vs tempodoze_um

Type off it: Custom Equations

New Equation > General Equations > equação de BAR > OK

Apply

Gráfico com o ajuste

Results: SSE, R^2 , RMSE e os parâmetros a (A), l (λ) e m (μ)

Para definir os parâmetros:

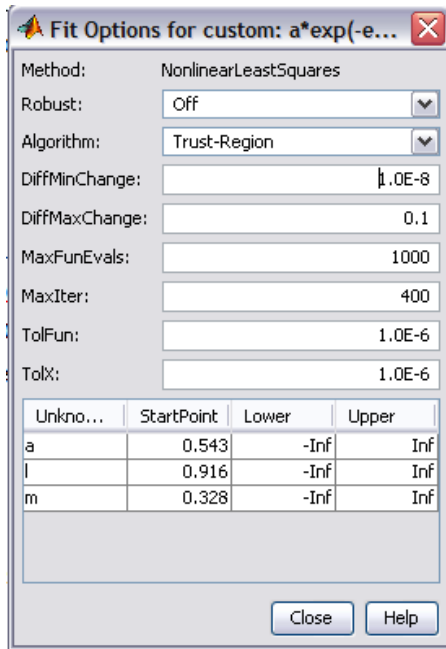
Fit options (caso o ajuste não esteja “bom”)

MaxFunEvals: aumentar o número de iterações por ex.: 1000

Pode-se mudar os valores de a, l ou m

Para finalizar clicar em Close

Figura 6 – Definição dos parâmetros de crescimento na rotina computacional feita no *software* MATLAB® R2010a versão 7.10



1.1.5 Comparação dos modelos primários

Para a comparação do ajuste dos modelos primários de BAR e GO os seguintes índices estatísticos foram utilizados: coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro médio quadrático (RMSE), fator bias e fator de exatidão (ROSS, 1996) conforme descrito no item 2.6 da Revisão da Literatura.

1.1.6 Associação do método direto e indireto para a construção das curvas de crescimento de BAL

Após a avaliação da influência da concentração do inóculo com *L. plantarum*, foram realizados experimentos com as três BAL associando os métodos de contagem de células viáveis (plaqueamento) e medida de absorbância para a construção das curvas de crescimento de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*.

Os frascos, contendo 160 mL de caldo MRS, foram inoculados com 1 % (v/v) de inóculo e incubados em estufa 30 °C e as curvas de crescimento para as três BAL foram acompanhadas até a fase estacionária. A concentração inicial dos experimentos foi de aproximadamente 10^3 UFC.mL⁻¹ e o pH inicial do meio de cultivo se manteve em torno de 6,0 (pH-metro V620, Analion, Ribeirão Preto, Brasil). Para a construção das curvas de crescimento, foram coletados, assepticamente em câmara de fluxo laminar, 2 mL da cultura pura para as leituras de absorbância (abs) em espectrofotômetro e 1 mL para o plaqueamento em intervalos de tempo preestabelecidos até que fosse atingida a fase estacionária. O plaqueamento foi realizado como descrito no item 1.1.2 deste capítulo. Os experimentos foram repetidos em dias diferentes gerando duplicata de experimentos, e cada dia de experimento foi conduzido com duplicata de erlenmeyers, e a temperatura mantida dentro das estufas de incubação foi registrada por um *datalogger* com registro de temperatura a cada 5 minutos.

1.1.7 Validação do modelo de correlação entre método direto e indireto para a obtenção das curvas de crescimento de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*

Para validar o modelo de correlação obtido para cada BAL, foram construídas curvas de crescimento, a partir de uma concentração celular de 10^3 UFC.mL⁻¹, com os dois métodos de contagem.

As curvas de correlação foram validadas nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C. Estas curvas foram comparadas entre si pelo Teste F segundo metodologia descrita por Neter et al. (1996), Francois et al. (2005) e Rodrigues e Iemma (2005). A análise estatística aplicada tem o objetivo de verificar se existe diferença significativa entre a inclinação e a intercepção das curvas de correlação. O teste apresenta duas hipóteses: Hipótese nula = H₀: as curvas de correlação são iguais entre si; Hipótese alternativa = H_a: as curvas de correlação não são iguais entre si. A avaliação do Teste F foi realizada na Análise de Dados do Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) e o intervalo de confiança avaliado foi de 95 % sendo $\alpha = 0,05$ (nível de significância).

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.2.1 Avaliação da influência da concentração de inóculo sobre o crescimento de *L. plantarum*

A Tabela 1 apresenta os índices estatísticos dos ajustes dos modelos de BAR e GO às curvas de crescimento de *L. plantarum* a 30 °C pelo método de absorbância, utilizando diferentes níveis de inóculo. No presente estudo, os valores do fator bias e fator de exatidão para todas as concentrações de inóculo analisadas foram próximos de 1,0 para os dois modelos primários ajustados. Os valores de RMSE foram em torno de 0,09-0,10 para o modelo de BAR e 0,07-0,08 para o modelo de GO e os valores de R² foram de aproximadamente 0,99 para todas as concentrações de inóculo, entre 10³ UFC.mL⁻¹ a 10⁷ UFC.mL⁻¹. Pode-se concluir que os dois modelos demonstram um bom ajuste aos dados experimentais analisados, sendo capazes de prever o crescimento de *L. plantarum* a 30 °C em diferentes concentrações de inóculo (10³ a 10⁷ UFC.mL⁻¹).

Tabela 1 - Comparação dos índices estatísticos calculados para os modelos primários de BAR e GO ajustados às curvas de crescimento de *L. plantarum* a 30 °C utilizando diferentes níveis de inóculo (10³ a 10⁷ UFC.mL⁻¹).

| Índices | Modelos | 10 ³ | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ |
|----------------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| RMSE | BAR | 0,105 | 0,096 | 0,096 | 0,091 | 0,105 |
| | GO | 0,083 | 0,074 | 0,072 | 0,067 | 0,075 |
| Bias | BAR | 0,997 | 0,884 | 0,955 | 1,031 | 1,021 |
| | GO | 1,061 | 1,008 | 1,001 | 0,980 | 1,004 |
| Exatidão | BAR | 1,246 | 1,186 | 1,165 | 1,073 | 1,061 |
| | GO | 1,350 | 1,240 | 1,144 | 1,066 | 1,033 |
| R² | BAR | 0,997 | 0,997 | 0,997 | 0,996 | 0,993 |
| | GO | 0,998 | 0,998 | 0,998 | 0,998 | 0,996 |

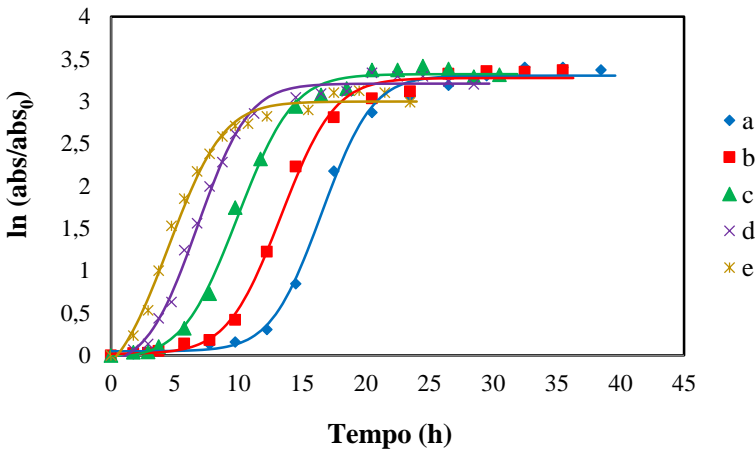
*Diferentes níveis de inóculo expressos em UFC.mL⁻¹

Para a determinação dos parâmetros de crescimento de *L. plantarum* nos cinco níveis de inóculo testados através de medidas de absorbância, foi escolhido o modelo de BAR pois, apresentou valores ligeiramente melhores para os índices estatísticos quando comparado com os valores dos índices do modelo de GO.

Na Figura 7, estão representadas as curvas de crescimento de

L. plantarum para as cinco concentrações de inóculo testadas, com o ajuste do modelo de BAR. Estas curvas de crescimento foram expressas em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ vs tempo (h). Para facilitar a visualização, cada temperatura foi representada por somente uma das duplicatas de cada experimento. Não foi possível calcular o desvio padrão dos pontos das curvas de crescimentos descritas na Figura 7 pois, a coleta dos pontos experimentais é realizada em horários diferentes em cada dia de experimento.

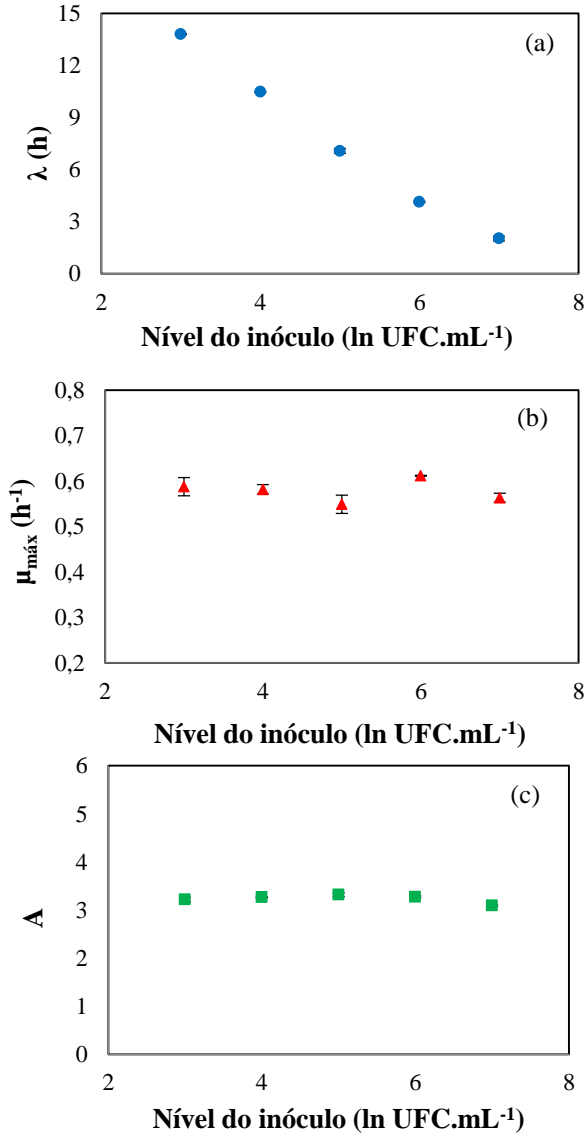
Figura 7 – Ajuste do modelo de BAR às curvas de crescimento de *L. plantarum* a 30 °C com diferentes níveis de inóculo, nas concentrações de 10^3 UFC.mL⁻¹ (a), 10^4 UFC.mL⁻¹ (b), 10^5 UFC.mL⁻¹ (c), 10^6 UFC.mL⁻¹ (d) e 10^7 UFC.mL⁻¹ (e).



Como observado na Figura 7, as curvas de crescimento de *L. plantarum* a 30 °C com diferentes concentrações de inóculo apresentam o mesmo formato, porém o parâmetro de crescimento que apresentou a maior diferença foi a fase lag, assim como observaram Mytilinaios et al. (2012) no estudo da predição das curvas de crescimento da *L. monocytogenes* em meio de cultivo na temperatura de 37 °C.

Os parâmetros de crescimento (λ , $\mu_{\text{máx}}$ e A), obtidos pelo ajuste do modelo de BAR às curvas de crescimento de *L. plantarum*, em relação aos diferentes níveis de inóculo (Figura 7) estudados neste trabalho, podem ser observados na Figura 8.

Figura 8 - Valores dos parâmetros de crescimento calculados utilizando o método de medidas de absorbância e diferentes níveis de inóculo ($\ln \text{ UFC.mL}^{-1}$) de *L. plantarum* a 30 °C. (●) duração da fase lag (λ [h]) (a), (▲) velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ [h^{-1}]) (b) e (■) aumento logarítmico da população (A) (c).



De acordo com a Figura 8, pode-se observar que os parâmetros de crescimento, velocidade específica máxima de crescimento (Figura 8b) e o aumento logarítmico da população (Figura 8c), calculados a partir das medidas de absorvância em função do tempo, não foram influenciados pelos diferentes níveis de inóculo, pois o valor médio do parâmetro $\mu_{\text{máx}}$ foi igual a $0,579 \text{ h}^{-1}$ ($\pm 0,02$) e o valor médio do parâmetro A foi $3,24$ ($\pm 0,09$), ambos apresentando um pequeno desvio padrão nas diferentes concentrações de inóculo estudadas. No entanto, a duração da fase lag foi o único parâmetro influenciado pelo nível do inóculo (Figura 8a) como consequência do limiar de detecção do método. A duração da fase lag para cada nível de inóculo analisado (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC mL^{-1}) foi de 13,8 h, 10,5 h, 7,1 h, 4,1 h e 2,0 h, respectivamente.

Segundo diferentes autores, os parâmetros de crescimento podem sofrer alterações devido a uma série de fatores, entre eles tem-se a variação no tamanho do inóculo que pode causar alterações na duração da fase lag e na velocidade específica máxima de crescimento, dependendo do método de quantificação celular utilizado (DUFFY et al., 1994; GAY; CERF; DAVEY, 1996; BARANYI, 1998; BARANYI e PIN, 1999; AUGUSTIN; ROSSO; CARLIER, 2000). Nos estudos das curvas de crescimento de *L. plantarum* e *Clostridium botulinum* 56A utilizando medidas de absorvância, sob condições ambientais fixas, variando apenas o nível inicial do inóculo tem-se que a velocidade específica de crescimento não é afetada (CUPPERS e SMELT, 1993; ZHAO; MONTIVILLE; SCHAFFNER, 2000). Smelt, Otten e Bos (2002) utilizaram o método de citometria de fluxo e verificaram que o tamanho do inóculo interfere na duração da fase lag de *L. plantarum*. Kaprelyants e Kell (1996) afirmaram que a duração da fase lag é inversamente proporcional ao tamanho do inóculo em alguns casos; Augustin, Rosso e Carlier (2000) observaram que a duração da fase lag de *Listeria monocytogenes* também é afetada pelos diferentes tamanhos de inóculo; Robinson et al. (2001) observaram que a variação no tamanho do inóculo não influencia a velocidade específica máxima de crescimento de *Listeria monocytogenes*, porém, a duração da fase lag é influenciada por esta variação quando a quantificação celular foi realizada no equipamento Bioscreen C. Estes estudos confirmam os resultados apresentados no presente trabalho.

Os resultados experimentais apresentados (Figura 8) mostram que apenas a duração da fase lag pode ser influenciada pelos diferentes níveis de inóculo, quando o crescimento bacteriano foi quantificado pelo método de medida de absorvância ao longo do tempo. Para confirmar a veracidade

destes resultados foram construídas curvas de crescimento utilizando o método de contagem de células viáveis ($\ln N$ (UFC.mL⁻¹)) ao longo do tempo (h) nas concentrações de inóculo de 10³, 10⁵ e 10⁷ UFC.mL⁻¹). A modelagem matemática destes dados experimentais, somente o modelo primário de BAR foi ajustado às curvas de crescimento, a fim de comparar com os dados do teste do inóculo já descritos anteriormente.

A Tabela 2 mostra os parâmetros de crescimento (λ , $\mu_{\text{máx}}$ e $N_{\text{máx}}$) das curvas de *L. plantarum*, na temperatura de 30 °C, calculados pelo ajuste do modelo de BAR. Nota-se que os parâmetros de crescimento de *L. plantarum* nos três níveis de inóculo testados apresentam diferenças tanto para os valores de λ , quanto para os valores de $\mu_{\text{máx}}$. Desta vez, o único parâmetro que não foi afetado pela variação na concentração inicial de inóculo foi a população máxima atingida ($N_{\text{máx}}$), que apresentou um valor médio de 22,4 ln UFC.mL⁻¹ ($\pm 0,33$) para os três níveis de inóculo analisados.

Tabela 2 - Parâmetros de crescimento de *L. plantarum* obtidos a partir de dados de contagem total calculados através do modelo primário de Baranyi e Roberts.

| Nível do inóculo | λ (h) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $N_{\text{máx}}$ * |
|--------------------------------------|---------------|---------------------------------------|--------------------|
| 10 ³ UFC.mL ⁻¹ | 2,12 | 0,723 | 22,9 |
| 10 ⁵ UFC.mL ⁻¹ | 0,56 | 0,653 | 22,2 |
| 10 ⁷ UFC.mL ⁻¹ | 0,00 | 0,446 | 22,2 |

* $N_{\text{máx}}$ é a população máxima atingida expressa em ln UFC.mL⁻¹

Os valores determinados para a duração da fase lag nos três níveis de inóculo testados na quantificação das BAL utilizando o método de contagem por plaqueamento, concorda com os resultados descritos por outros autores, anteriormente, como por exemplo, a afirmação que Kaprelyants e Kell (1996) fizeram sobre que a duração da fase lag é inversamente proporcional ao tamanho do inóculo em alguns casos. No entanto, os valores determinados para o parâmetro $\mu_{\text{máx}}$, pelos dois métodos de contagem estudados neste trabalho, diferiram entre si, pois quando o método utilizado foi o plaqueamento, os valores da velocidade específica máxima de crescimento decresceram com o aumento da concentração de inóculo, enquanto que para o método de medida de absorbância, o parâmetro $\mu_{\text{máx}}$ apresentou um valor médio igual a 0,579 h⁻¹ ($\pm 0,02$) conforme os dados apresentados na Figura 8 e Tabela 2. Estas diferenças entre os parâmetros de crescimento estimados através das medidas de absorbância e os estimados através do método de contagem de células viáveis para *Listeria monocytogenes*, também foram

observadas por Augustin, Rosso e Carlier (1999).

Os resultados apresentados demonstraram que o uso isolado do método de medida de absorvância não é eficiente para a determinação da duração da fase lag devido a limitação do método que exige uma elevada concentração inicial do inóculo para que os resultados de quantificação microbiana estejam corretos (BATY; FLANDROIS; DELIGNETTE-MULLER, 2002; DALGAARD et al., 1994, DALGAARD e KOUTSOUMANIS, 2001; PERNI; ANDREW; SHAMA, 2005). Para que seja possível estudar as curvas de crescimento das BAL em meio de cultivo, que se aproximem da realidade dos produtos cárneos, ou seja, que apresentem normalmente uma carga inicial de BAL em torno de 10 UFC.g^{-1} (KOUTSOUMANIS et al., 2008), é necessário encontrar um método para a construção destas curvas de crescimento que seja rápido, seguro e eficiente.

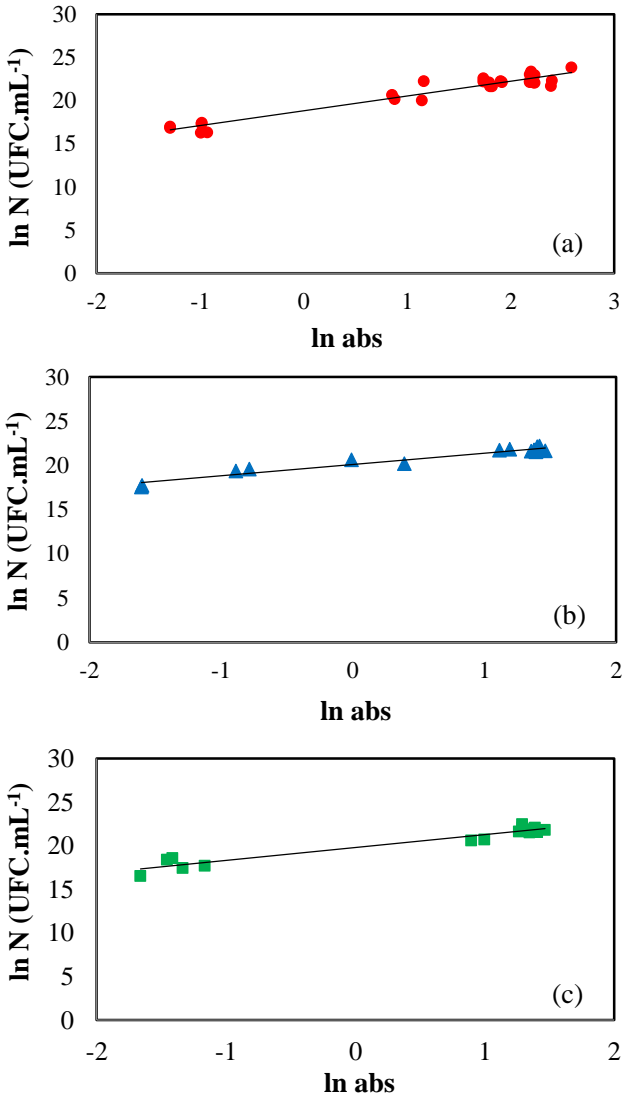
1.2.2 Obtenção do modelo de correlação entre o método de absorvância e plaqueamento

Com base nos resultados obtidos, no item anterior (1.2.1) deste capítulo, a respeito dos dois métodos de quantificação microbiana, medidas de absorvância e contagem de células viáveis por plaqueamento, foi investigada uma associação entre estes dois métodos de construção das curvas de crescimento, com concentração inicial de inóculo de 10^3 UFC.mL^{-1} , que fosse capaz de gerar dados confiáveis. Esta concentração inicial de inóculo baixa (10^3 UFC.mL^{-1}) foi escolhida, como explicado anteriormente, para que os experimentos em meio de cultivo produzam resultados que possam ser associados à realidade dos produtos cárneos, que apresentam uma carga inicial baixa de BAL.

Foram realizadas transformações logarítmicas para ambos os valores das medidas de absorvância e da contagem de células viáveis, a fim de atenuar a variação entre os dados analisados e equalizar as diferenças entre os dados. Estes dados transformados foram utilizados para ajustar uma curva de regressão linear, como pode ser observado na Figura 9, e a curva de correlação que permitiu relacionar as medidas de absorvância com a contagem de células viáveis foi estabelecida.

As Equações 22, 23 e 24 representam as correlações dos dois métodos de quantificação microbiana, e os R^2 de 0,936, 0,949 e 0,936 para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. Estes resultados indicam que as equações de correlação podem ser utilizadas para prever a concentração celular (UFC.mL^{-1}) das BAL.

Figura 9 - Curvas de correlação entre \ln Absorbância versus \ln da contagem de células viáveis para *L. plantarum* (●) (a), *W. viridescens* (▲) (b) e *L. sakei* (■) (c) na temperatura de 30 °C.



$$\ln N = 1,7159 (\ln \text{abs}) + 18,828 \quad (22)$$

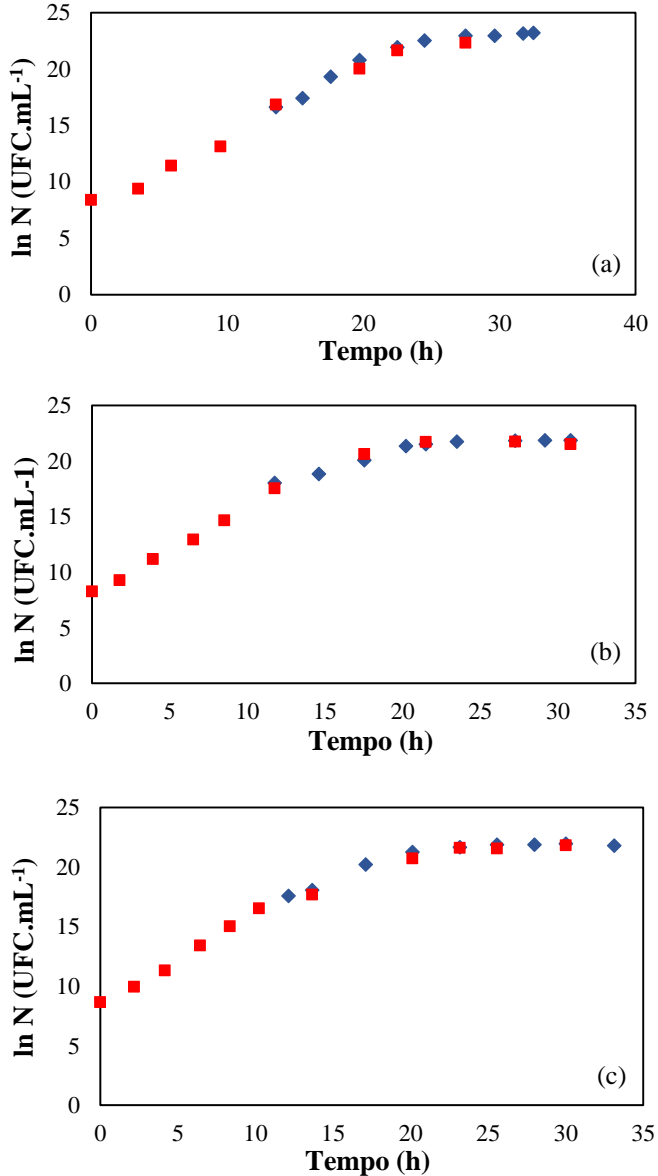
$$\ln N = 1,2743 (\ln \text{abs}) + 20,087 \quad (23)$$

$$\ln N = 1,4789 (\ln \text{abs}) + 19,792 \quad (24)$$

A obtenção de uma relação linear entre $\ln \text{abs}$ e $\ln N$ (UFC.mL⁻¹), utilizando transformações logarítmicas, também foi verificada na avaliação do crescimento de *Pseudomonas fragi* (HUDSON e MOTT, 1994), *Bacillus cereus* (CHORIN et al., 1997), *Lactococcus lactis* (FRANCOIS et al., 2003) e *Listeria monocytogenes* (FRANCOIS et al., 2005).

Estas relações lineares apresentadas pelas Equações 22, 23 e 24 foram validadas mediante a comparação feita entre os dados de contagem de células viáveis determinados por plaqueamento e os dados de contagem de células viáveis definidos pelos modelos de correlação obtidos para cada BAL, como mostra a Figura 10.

Figura 10 - Dados experimentais de medidas de Abs (\blacklozenge) (convertidos pelo modelo de correlação) e contagem de células viáveis (\blacksquare) de uma curva de crescimento de *L. plantarum* (a), *L. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) a 30 °C com concentração inicial de inóculo 10^3 UFC.mL⁻¹.



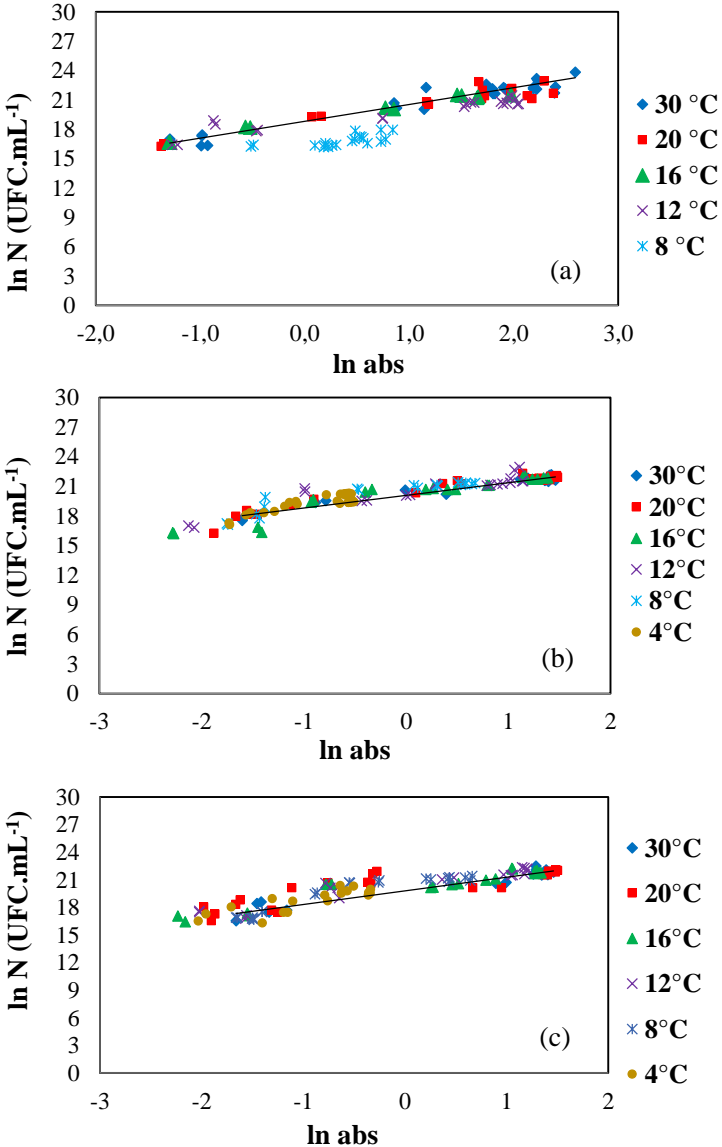
Após a concentração celular atingir aproximadamente 10^7 UFC.mL⁻¹, foram utilizados os modelos de correlação definidos na Figura 9 para converter os valores de medidas de absorvância em contagem de células viáveis. Para validar a utilização deste método, as curvas de crescimento das três BAL foram construídas utilizando o método de contagem por plaqueamento e o método de medida de absorvância simultaneamente até a fase estacionária de crescimento.

De acordo com a Figura 10, observou-se que os modelos de correlação testados relacionaram as medidas de absorvância e a contagem por plaqueamento quando o crescimento das BAL atinge a concentração de 10^6 - 10^7 UFC.mL⁻¹. Para valores inferiores a este, o único método utilizado para quantificar as curvas de crescimento deve ser o plaqueamento.

1.2.3 Validação do modelo de correlação entre os métodos direto e indireto para a obtenção das curvas de crescimento de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*

As curvas de correlação nas temperaturas de 4, 8, 12, 16 e 20 °C foram comparadas com as curvas de correlações para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* demonstradas na Figura 9, na temperatura ótima de crescimento (30 °C). Na Figura 11, tem-se a comparação entre as curvas de correlação de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* nas temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

Figura 11 - Correlação entre os dados de absorvância ($\ln \text{abs}$) e os dados de contagem de células viáveis ($\ln N$) de *L. plantarum* (a), *W. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) nas temperaturas de crescimento testadas (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C). A linha contínua representa a correlação na temperatura de 30 °C da Figura 9.



Como pode ser observado na Figura 11a, os dados experimentais da relação linear $\ln \text{ abs vs } \ln N$ (UFC.mL^{-1}) de *L. plantarum* nas temperaturas de 12, 16 e 20 °C ficaram bem próximos da curva de correlação na temperatura ótima de 30 °C. O mesmo não foi observado com a comparação feita com a relação linear de *L. plantarum* a 8 °C mostrando que, em condições drásticas de temperatura (temperatura de refrigeração), esta BAL apresenta mudanças devido ao *stress* a qual foi submetida. Fatores de *stress* ambiental como a temperatura podem afetar a curva de calibração que descreve a relação entre as medidas de absorbância e contagem de células viáveis devido a uma diminuição na viabilidade celular quando as condições ambientais se tornam mais rigorosas (CHORIN et al., 1997). Isto foi comprovado mediante a análise do Teste F, pois a curva de correlação de *L. plantarum* na temperatura de 8 °C (Figura 11a), demonstrou uma diferença significativa ao nível de significância de 5% quando comparada com a curva de correlação a 30 °C, dado que o valor de p foi menor que o nível de significância ($\alpha = 0,05$), isto é, rejeita-se a hipótese nula (H_0). Na temperatura de refrigeração de 4 °C, *L. plantarum* não apresentou crescimento. Para as demais temperaturas, o valor de p foi maior que o nível de significância, com isso não rejeita-se H_0 , concluindo-se que as curvas de correlação analisadas não apresentam diferença entre si a 5% de significância.

Em seus estudos sobre a influência de fatores ambientais sobre a relação existente entre dados de absorbância e contagem de células viáveis de *L. monocytogenes*, Francois et al. (2005) relataram que condições ambientais mais rigorosas podem provocar uma mudança na relação entre absorbância e contagem de células viáveis. Estes autores também concluíram que a correlação entre as medidas com transformações logarítmicas foi mais eficiente para relacionar os dados de medidas de absorbância e contagem de células viáveis, do que a correlação feita entre os dados diretos, ou seja, sem utilizar o Log. As alterações nas curvas de correlação, devido a estresses ambientais, também foram verificadas por Valero et al. (2006) em seu estudo sobre o uso das curvas de correlação em diferentes condições ambientais para prever a velocidade específica de crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Já nas Figuras 11b e 11c foi observado que os dados experimentais de *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente, ficaram bem próximos à curva de correlação logarítmica na temperatura ótima de 30 °C. E na avaliação do Teste F as curvas de correlação destas duas BAL, não apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que o valor de p foi

maior que o nível de significância ($p > 0,05$).

A partir dos resultados obtidos até o momento, determinou-se que as curvas de crescimento das BAL, independente das temperaturas testadas, serão obtidas pela associação dos métodos de absorvância e contagem de células viáveis, utilizando-se as curvas de correlação na temperatura ótima de 30 °C, quando o crescimento, determinado pelo plaqueamento, atingir a concentração celular de 10^7 UFC.mL⁻¹. Antes disto, nas concentrações iniciais de 10^3 até a BAL atingir 10^6 UFC.mL⁻¹, o único método utilizado para a construção das curvas de crescimento é a contagem das células viáveis por plaqueamento.

As associações feitas entre o método de medida de absorvância e o método de contagem de células viáveis, a fim de construir as curvas de crescimento dos microrganismos, também foram sugeridas por outros autores a fim de estimar os parâmetros de crescimento microbiano (BRÉAND et al., 1997; STEPHENS et al., 1997; AUGUSTIN; ROSSO; CARLIER, 1999).

1.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

A técnica de medida de absorvância é limitada, uma vez que o método não detecta concentrações inferiores a 10^6 - 10^7 UFC.mL⁻¹.

O uso isolado do método de medida de absorvância não é eficiente para a determinação da duração da fase lag e os valores da velocidade específica máxima de crescimento determinados pelos dois métodos de quantificação, medidas de absorvância e plaqueamento, diferiram entre si.

As curvas de crescimento das BAL, independente das temperaturas testadas, serão obtidas pela associação dos métodos de medidas de absorvância e plaqueamento, utilizando o modelo de correlação na temperatura ótima de crescimento de 30 °C.

1.4 REFERÊNCIAS

AUGUSTIN, J. C.; ROSSO, L.; CARLIER, V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 576, p. 169-181, 2000.

AUGUSTIN, J. C.; ROSSO, L.; CARLIER, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 38, p. 137-146, 1999.

BARANYI, J. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. **Journal of Theoretical Biology**, v. 192, p. 403-408, 1998.

BARANYI, J.; PIN, C. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 732-736, 1999.

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

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 261-277, 2004.

BATY, F.; FLANDROIS, J.P.; DELIGNETTE-MULLER, M.L. Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5816-5825, 2002.

BRÉAND, S.; FARDEL, G.; FLANDROIS, J. P.; ROSSO, L.; TOMASSONE, R. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 157-167, 1997.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: A comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v. 14, p. 313-326, 1997.

CHORIN, E.; THUAULT, D.; CLÉRET, J-J.; BOURGEOIS, C-M. Modelling *Bacillus cereus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 229-234, 1997.

CUPPERS, H. G. A. M.; SMELT, J. P. P. M. Time to turbidity measurement as a tool for modeling spoilage by *Lactobacillus*. **Journal of Industrial Microbiological**, v. 12, p.168-171, 1993.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. 2010. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2010.

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 183-196, 2001.

DALGAARD P.; ROSS, T.; KAMPERMAN, L.; NEUMEYER, K.; McMEEKIN, T. A. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 391-404, 1994.

DUFFY, G.; SHERIDAN, J. J.; BUCHANAN, R. L.; MCDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in selective enrichment broths. **Food Microbiology**, v. 11, p. 429-438, 1994.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FRANCOIS, K.; DEVLIEGHERE, F.; STANDAERT, A. R.; GEERAERD, A. H.; COOLS, I.; VAN IMPE, J. F.; DEBEVERE, J. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1503-1515, 2005.

FRIZZO, L. S.; ZBRUN, M. V.; SOTO, L. P.; BERTOZZI, E.; SIGNORINI, M. L.; SEQUEIRA, G. J.; MARTI, L. E.; DALLA SANTINA, R.; PERDIGON, G.; ROSMINI, M. R. Protective effect of an inoculum of lactic acid bacteria from bovine origin against *Salmonella* serotype dublin in the intestinal tract of mice. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, i. 16, p. 2113-2122, 2010.

GARCÍA-GIMENO, R. M.; MARTÍNEZ, C. H.; SILÓNIZ, M. I. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 19-30, 2002.

GAY, M.; CERF, O.; DAVEY, K. R. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14°C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 433-438, 1996.

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

HUDSON, J. A.; MOTT, S. J. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. **Journal of Food Safety**, v. 14, p. 329-339, 1994.

KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B. Do bacteria need to communicate with each other for growth? **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 237-242, 1996.

KOCH, A. L. **Growth measurement**. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. (Eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 249-277, 1994.

MYTILINAIOS, I.; SALIH, M.; SCHOFIELD, H. K.; LAMBERT, R. J. W. Growth curve prediction from optical density data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 169-176, 2012.

NETER, J.; KUTNER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**, 4th ed. p. 468-474, Chicago, IL: Irwin, 1996.

PERNI, S.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. **Food Microbiology**, v. 22, p. 491-495, 2005.

ROBINSON, T. P.; ABOABA, O. O.; KALOTI, A.; OCIO, M. J.; BARANYI, J.; MACKEY, B. M. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 163-173, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

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

SMELT, J. P. P. M.; OTTEN, G. J.; BOS, A. P. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 207-212, 2002.

STEPHENS, P. J.; JOYNSON, J. A.; DAVIES, K. W.; HOLBROOK, R.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HUMPHREY, T. J. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 445-455, 1997.

VALERO, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G. Modeling the growth rate of *Listeria monocytogenes* using absorbance measurements and calibration curves. **Food Microbiology and Safety**, v. 71, n. 7, p. M257-M264, 2006.

ZHAO, L.; MONTIVILLE, T. J.; SCHAFFNER, D. W. Inoculum size of *Clostridium botulinum* 56A spores influence time-to-detection and percent growth-positive sample. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1369-1375, 2000.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.

CAPÍTULO 2

2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO DE CULTURAS PURAS DE *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* E *Lactobacillus sakei* EM CALDO MRS SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS.

Dentre os fatores intrínsecos (pH, a_w , composição do alimento, interações entre os microrganismos) e extrínsecos (temperatura, atmosfera da embalagem, umidade) que afetam o crescimento microbiano, a temperatura é considerada um dos fatores mais importantes que influenciam na deterioração dos alimentos. Mediante isso, surge o interesse de estudar a influência da temperatura sobre o crescimento de culturas puras de *Lactobacillus plantarum*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus sakei* em meio de cultivo sob condições isotérmicas.

Neste capítulo, foi avaliado o ajuste dos modelos primários de crescimento aos dados experimentais das três BAL e o modelo escolhido foi aquele que forneceu os melhores índices estatísticos definindo as características dos microrganismos em estudo. Em seguida, o ajuste dos modelos secundários que irá demonstrar o comportamento dos parâmetros de crescimento duração da fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e população máxima atingida ($N_{\text{máx}}$) nas diferentes temperaturas de incubação testadas.

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Centro Tecnológico (CTC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Bactérias

As cepas das BAL utilizadas foram descritas no item 1.1.1 do Capítulo 1.

2.1.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito no item 1.1.2 do Capítulo 1.

2.1.3 Condições de crescimento

Os experimentos das culturas puras das BAL foram realizados em frascos de 250 mL, com volume útil de 160 mL de caldo MRS e com 1 % (v/v) de inóculo. A concentração inicial dos experimentos foi de aproximadamente 10^3 UFC.mL⁻¹ e o pH inicial do meio de cultivo se manteve em torno de 6,0 (pH-metro V620, Analion, Ribeirão Preto, Brasil). Os frascos foram incubados em estufa (Dist, Florianópolis, Brasil) em seis diferentes temperaturas de incubação: 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C e as curvas de crescimento foram acompanhadas até a fase estacionária. Este procedimento foi realizado para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*. Os experimentos foram repetidos em dias diferentes gerando duplicata de experimentos, cada dia de experimento foi conduzido com duplicata de erlenmeyers, e a temperatura mantida dentro das estufas de incubação foi registrada por um *datalogger* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha) a cada 5 minutos.

2.1.4 Amostragem

O acompanhamento do aumento da concentração celular foi realizado utilizando-se os métodos de contagem de células viáveis e medida de absorvância (abs). O método de contagem de células viáveis em placa foi feito nas seis temperaturas de crescimento testadas ao longo de toda curva de crescimento e o plaqueamento foi realizado como descrito no item 1.1.2 do Capítulo 1. Simultaneamente, utilizou-se o método de medida de abs no qual foram coletados, assepticamente em câmara de fluxo laminar (CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil), 2 mL da cultura pura para as leituras de abs em espectrofotômetro (Bel Photonics 1105, Monza, Itália) em intervalos de tempo preestabelecidos, dependendo da temperatura de incubação (4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C). As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 600 nm. A partir do momento em que a leitura da abs começou a detectar o crescimento, a predição da concentração celular também foi feita por um modelo de correlação determinado para cada BAL. O acompanhamento do pH foi feito para cada uma das BAL nas seis temperaturas estudadas, utilizando-se de um pHmetro (pH-metro V620, Analion, Ribeirão Preto, Brasil). Juntamente com a coleta das medidas de absorvância e o plaqueamento.

2.1.5 Modelo de correlação

O modelo de correlação utilizado para relacionar os dois métodos

de acompanhamento do crescimento bacteriano foi descrito pela relação linear entre o logaritmo natural das medidas de absorvância ($\ln \text{ abs}$) e o logaritmo natural da contagem de células viáveis ($\ln \text{ UFC.mL}^{-1}$). Foram realizadas transformações logarítmicas nos valores das medidas de absorvância e da contagem de células viáveis a fim de atenuar a variação entre os dados analisados, estas transformações também foram utilizadas nos trabalhos de HUDSON e MOTT (1994), CHORIN et al. (1997), FRANCOIS et al. (2003) e FRANCOIS et al. (2005).

2.1.6 Modelos primários de crescimento

Os modelos primários de BAR (BARANYI e ROBERTS, 1994) e GO (GIBSON, BRATCHELL, ROBERTS, 1987) foram selecionados para descrever o crescimento das BAL nas seis temperaturas de incubação estudadas, a fim de obter os parâmetros de crescimento: duração da fase lag (λ [h]), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ [h^{-1}]) e população bacteriana máxima ($N_{\text{máx}}$ [UFC.mL⁻¹]). Para facilitar a comparação entre os modelos, os dados foram expressos como logaritmo natural. O ajuste dos modelos foi feito no *software* MATLAB® R2010a versão 7.10 (MathWorks, Natick, USA) e as equações dos modelos de BAR e GO estão descritas no item 2.2.2 da Revisão da Literatura.

2.1.7 Modelos secundários

Os modelos secundários são caracterizados por descreverem, através de equações matemáticas, como os parâmetros do modelo primário são alterados com alguns fatores, como temperatura, pH, atividade de água, entre outros. Foram avaliadas cinco equações matemáticas como modelos secundários: equação Linear, equação da Raiz quadrada (RATKOWSKY et al., 1982), equação tipo Arrhenius (DALCANTON, 2010), equação da Potência e equação Exponencial, com o objetivo de verificar como a variação de temperatura (entre 4 e 30 °C) influencia os parâmetros de crescimento de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*.

Os modelos secundários foram ajustados utilizando o *software* MATLAB® R2010a versão 7.10 (MathWorks, Natick, USA). As Equações 25, 26, 27, 28 e 29 demonstram as equações dos modelos secundários.

$$\text{Modelo Linear: } p = b + rT \quad (25)$$

$$\text{Modelo da Raiz quadrada: } p^{1/2} = b(T - T_{\min}) \quad (26)$$

$$\text{Modelo do tipo Arrhenius: } \ln p = a \left(\frac{1}{T} \right) + b \quad (27)$$

$$\text{Modelo da Potência: } p = b \cdot T^n \quad (28)$$

$$\text{Modelo Exponencial: } p = a \cdot \exp(bT) \quad (29)$$

onde p é o parâmetro de interesse a ser modelado (λ , μ_{\max} ou N_{\max}), T é a temperatura (°C), T_{\min} é a temperatura teórica mínima para o crescimento microbiano (°C) e a , b , r e n são parâmetros dos modelos.

2.1.8 Comparação estatística dos modelos

Para comparação do ajuste dos modelos primários e modelos secundários, os seguintes índices estatísticos foram utilizados: coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator bias e fator de exatidão (ROSS, 1996) conforme descrito no item 2.6 da Revisão da Literatura.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Ajuste dos modelos primários às curvas de crescimento das BAL

Na Tabela 3, tem-se os valores dos índices estatísticos MSE, R^2 , fator bias e fator de exatidão comparando os ajustes dos modelos primários de Baranyi e Roberts e Gompertz às curvas de crescimento isotérmico de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*.

Tabela 3 - Valores dos índices MSE, R^2 , fator bias e fator de exatidão para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts e o modelo de Gompertz às curvas de crescimento isotérmico de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* às temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

| <i>L. plantarum</i> | | | | | | | |
|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Índices | Modelos | 4 °C | 8 °C | 12 °C | 16 °C | 20 °C | 30 °C |
| MSE | BAR | NC | 0,250 | 0,286 | 0,073 | 0,159 | 0,117 |
| | GO | NC | 0,289 | 0,296 | 0,152 | 0,218 | 0,276 |
| R² | BAR | NC | 0,983 | 0,992 | 0,998 | 0,995 | 0,996 |
| | GO | NC | 0,980 | 0,992 | 0,995 | 0,993 | 0,990 |
| bias | BAR | NC | 1,001 | 1,001 | 1,000 | 1,001 | 1,000 |
| | GO | NC | 1,001 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| exatidão | BAR | NC | 1,030 | 1,023 | 1,015 | 1,016 | 1,012 |
| | GO | NC | 1,034 | 1,028 | 1,019 | 1,019 | 1,020 |
| <i>W. viridescens</i> | | | | | | | |
| Índices | Modelos | 4 °C | 8 °C | 12 °C | 16 °C | 20 °C | 30 °C |
| MSE | BAR | 0,117 | 0,218 | 0,146 | 0,109 | 0,132 | 0,149 |
| | GO | 0,207 | 0,050 | 0,152 | 0,097 | 0,136 | 0,090 |
| R² | BAR | 0,996 | 0,995 | 0,995 | 0,997 | 0,997 | 0,996 |
| | GO | 0,992 | 0,998 | 0,995 | 0,997 | 0,996 | 0,997 |
| bias | BAR | 1,000 | 1,009 | 1,001 | 1,000 | 1,001 | 1,001 |
| | GO | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| exatidão | BAR | 1,016 | 1,023 | 1,015 | 1,012 | 1,018 | 1,013 |
| | GO | 1,021 | 1,010 | 1,012 | 1,015 | 1,016 | 1,013 |
| <i>L. sakei</i> | | | | | | | |
| Índices | Modelos | 4 °C | 8 °C | 12 °C | 16 °C | 20 °C | 30 °C |
| MSE | BAR | 0,115 | 0,070 | 0,443 | 0,142 | 0,405 | 0,150 |
| | GO | 0,226 | 0,099 | 0,411 | 0,111 | 0,304 | 0,091 |
| R² | BAR | 0,995 | 0,997 | 0,986 | 0,996 | 0,986 | 0,995 |
| | GO | 0,990 | 0,996 | 0,987 | 0,997 | 0,990 | 0,997 |
| bias | BAR | 1,000 | 1,000 | 1,001 | 1,001 | 1,001 | 1,001 |
| | GO | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| exatidão | BAR | 1,017 | 1,011 | 1,024 | 1,015 | 1,026 | 1,016 |
| | GO | 1,025 | 1,014 | 1,024 | 1,015 | 1,019 | 1,010 |

De acordo com a análise dos índices estatísticos (MSE, R^2 , bias e exatidão), os dois modelos primários avaliados (BAR e GO) apresentaram um bom ajuste às curvas de crescimento das bactérias em estudo. No entanto, o modelo de BAR foi escolhido para a definição dos parâmetros

de crescimento das três BAL em estudo (Tabela 4), pois quando comparado com o modelo de GO, ele apresentou valores mais precisos para a duração da fase lag. Baty e Delignette-Muller (2004), quando compararam o modelo de BAR (BARANYI e ROBERTS, 1994), GO modificado (ZWIETERING et al., 1990) e o modelo Lag-exponencial (BUCHANAN; WHITING; DAMERT, 1997), segundo suas interpretações biológicas para a fase lag (λ), suas equações matemáticas e seus resultados de comparação estatística também escolheram o modelo de BAR, pois este foi o modelo mais constante entre os três modelos analisados.

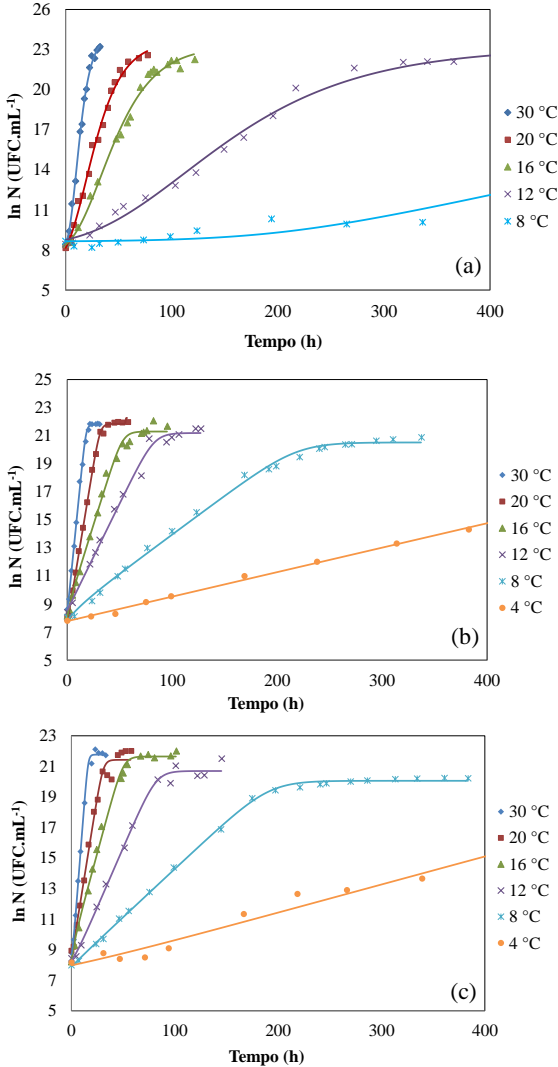
Tabela 4 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de BAR para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* nas diferentes temperaturas de cultivo.

| <i>L. plantarum</i> | Parâmetros de crescimento | | |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| | λ (h) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $N_{\text{máx}}$ (ln UFC.mL ⁻¹) |
| 30 °C | 0,3 | 0,65 | 22,7 |
| 20 °C | 2,0 | 0,30 | 22,5 |
| 16 °C | 3,7 | 0,16 | 21,9 |
| 12 °C | 12,0 | 0,06 | 22,2 |
| 8 °C | 127,9 | 0,01 | 16,9 |
| 4 °C | NC* | NC* | NC* |
| <i>W. viridescens</i> | Parâmetros de crescimento – BAR | | |
| | λ (h) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $N_{\text{máx}}$ (ln UFC.mL ⁻¹) |
| 30 °C | 0,0 | 0,78 | 21,9 |
| 20 °C | 0,0 | 0,43 | 21,9 |
| 16 °C | 0,0 | 0,25 | 21,8 |
| 12 °C | 0,0 | 0,16 | 21,4 |
| 8 °C | 0,0 | 0,06 | 20,9 |
| 4 °C | 0,0 | 0,02 | 19,4 |
| <i>L. sakei</i> | Parâmetros de crescimento – BAR | | |
| | λ (h) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $N_{\text{máx}}$ (ln UFC.mL ⁻¹) |
| 30 °C | 0,0 | 0,78 | 21,9 |
| 20 °C | 0,0 | 0,34 | 21,9 |
| 16 °C | 0,0 | 0,24 | 21,7 |
| 12 °C | 0,0 | 0,17 | 21,2 |
| 8 °C | 0,0 | 0,06 | 20,2 |
| 4 °C | 0,0 | 0,02 | 19,5 |

*NC = não houve crescimento

O ajuste do modelo de BAR às curvas de crescimento é apresentado na Figura 12. Para facilitar a visualização, cada temperatura foi representada por somente uma curva de cada experimento.

Figura 12 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. plantarum* (a), *W. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) em diferentes temperaturas.



A duração da fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento são fortemente influenciadas pela temperatura de incubação (Tabela 4). Com a diminuição da temperatura, ocorre um aumento da fase lag somente para *L. plantarum*. As outras duas bactérias não apresentaram fase de adaptação em nenhuma das temperaturas estudadas. Foi observada uma diminuição da velocidade específica máxima de crescimento com a diminuição da temperatura. Esta tendência foi observada por outros autores, que também verificaram que os parâmetros de crescimento das BAL são influenciados pela variação da temperatura de crescimento (GIANNUZZI et al., 1998; SLOGO et al., 2009; DALCANTON, 2010; LI et al., 2013).

Não foi observado crescimento de *L. plantarum* a 4 °C (Tabela 4). Dalcanton (2010) também verificou que *L. plantarum* não apresentou crescimento na temperatura de 4 °C durante seis meses, quando avaliaram o efeito combinado da temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio na velocidade de crescimento desta BAL. Manios, Lambert e Skandamis (2014), estudando a deterioração de emulsões ácidas à base de pimenta, berinjela e fava causada por *L. plantarum* e *L. brevis*, observaram que na temperatura de 4 °C as BAL não apresentavam crescimento nas emulsões.

Os parâmetros considerados mais importantes quando se analisa a vida útil dos produtos cárneos são a duração da fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento (GEITENES et al., 2013). No entanto, o controle da população máxima pode ocasionar o aumento da vida útil dos produtos contaminados. Cayré, Garro e Vignolo (2005), quando avaliaram o efeito da temperatura de armazenamento (0, 8 e 15 °C) no crescimento das BAL em embutidos cárneos embalados em diferentes permeabilidades ao oxigênio, verificaram a ausência da fase lag nas curvas de crescimento ajustadas pelo modelo de Gompertz modificado. Geitenes et al. (2013) constataram a ausência da fase lag na modelagem do crescimento de BAL nas amostras de apresuntado e presunto cozido fatiados e embalados a vácuo na temperatura de 5 °C. As curvas foram ajustadas pelos modelos de Gompertz modificado e Logístico e as amostras já tinham contagens elevadas no primeiro dia de vida útil.

A partir dos resultados definidos para a fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento na Tabela 4, é possível determinar o parâmetro h_0 , utilizado no ajuste do modelo de BAR, pela equação 5 descrita no item 2.2.2.1 da Revisão da Literatura. Para *W. viridescens* e *L. sakei* o valor médio de h_0 definido no modelo BAR foi igual a zero, pois as curvas de crescimento destas BAL não apresentaram fase de adaptação, ou seja, fase lag igual a zero. Para *L. plantarum* foi definido um valor de h_0 para cada temperatura de incubação, sendo o valor médio

de 0,74 ($\pm 0,55$), considerando-se toda a faixa de temperatura estudada (8 a 30 °C).

De acordo com os resultados da Tabela 4 e Figura 12, pode-se verificar a importância de manter as temperaturas de incubação abaixo de 8 °C para diminuir o crescimento das BAL. Os valores da população máxima atingida nas temperaturas de 4 e 8 °C foram menores quando comparadas com as demais temperaturas de incubação, mostrando que o aumento desta variável influencia diretamente o desenvolvimento das BAL. Como os produtos cárneos são normalmente armazenados numa faixa de temperatura entre 0 °C e 10 °C (BRASIL, 1999) existe a necessidade de que haja um controle deste parâmetro, pois, com o aumento da temperatura de incubação de 8 para 12 °C, a velocidade específica máxima de crescimento das BAL aumenta mais de 77%, 60% e 64% para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. Já com o aumento da temperatura de incubação de 4 para 12 °C a velocidade específica máxima de crescimento das BAL aumenta mais de 86% e 89% para *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. Estes pequenos aumentos de temperatura (variação de 4 °C) ocasionam alterações em todos os parâmetros de crescimento, como pode ser observado na Figura 12. A partir disto, demonstra-se como o controle da temperatura na cadeia de frio dos alimentos torna-se imprescindível para que ocorra um controle do desenvolvimento e multiplicação de bactérias deteriorantes, como as BAL.

As demais repetições das curvas de crescimento de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* nas seis temperaturas de incubação testadas estão no Apêndice 1.

2.2.2 Modelos secundários

A influência da variação da temperatura (entre 4 a 30 °C) sobre os parâmetros de crescimento, obtidos pelo ajuste do modelo de BAR, foi descrita pela comparação (R^2) do ajuste dos modelos Linear, Raiz quadrada, tipo Arrhenius, Potência e Exponencial aos dados experimentais. Os modelos secundários que melhor descreveram essa influência são apresentados na Tabela 5, para as três bactérias estudadas.

Tabela 5 - Equações dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento (λ , μ e $N_{\text{máx}}$) de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*.

| <i>L. plantarum</i> | | | |
|---------------------------------------|--|----------------------|----------------|
| Parâmetros | Equação | R² | Modelo |
| λ (h) | $\lambda = 1E + 06 \cdot T^{-4,517}$ | 0,989 | Potência |
| $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $\sqrt{\mu_{\text{máx}}} = 0,031 \cdot T - 0,127$ | 0,992 | Raiz quadrada |
| $N_{\text{máx}}^*$ | $\ln N_{\text{máx}} = -3,166 \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + 3,273$ | 0,786 | tipo Arrhenius |
| <i>W. viridescens</i> | | | |
| Parâmetros | Equação | R² | Modelo |
| $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $\sqrt{\mu_{\text{máx}}} = 0,028 \cdot T + 0,038$ | 0,993 | Raiz quadrada |
| $N_{\text{máx}}^*$ | $\ln N_{\text{máx}} = -0,591 \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + 3,112$ | 0,991 | tipo Arrhenius |
| <i>L. sakei</i> | | | |
| Parâmetros | Equação | R² | Modelo |
| $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $\sqrt{\mu_{\text{máx}}} = 0,028 \cdot T + 0,037$ | 0,993 | Raiz quadrada |
| $N_{\text{máx}}^*$ | $\ln N_{\text{máx}} = -0,581 \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + 3,105$ | 0,923 | tipo Arrhenius |

*ln UFC.mL⁻¹

Através das equações obtidas (Tabela 5), pode-se prever os parâmetros de crescimento de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* dentro da faixa de temperatura estudada neste trabalho (4 °C a 30 °C), devido ao fato dos modelos apresentarem bons coeficientes de correlação, com exceção do coeficiente de correlação para o parâmetro $N_{\text{máx}}$ de *L. plantarum*. As Figuras 13, 14 e 15 apresentam o ajuste dos modelos secundários selecionados para os parâmetros de crescimento de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. A temperatura de 4 °C não estará presente no intervalo avaliado de *L. plantarum* (Figura 13) devido ao fato desta bactéria não ter apresentado crescimento, como já descrito anteriormente.

Figura 13 - Modelos secundários que descrevem o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento (\blacklozenge) λ (a), (\bullet) $\mu_{\text{máx}}$ (b) e (\blacktriangle) $N_{\text{máx}}$ (c) para *L. plantarum*. A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado.

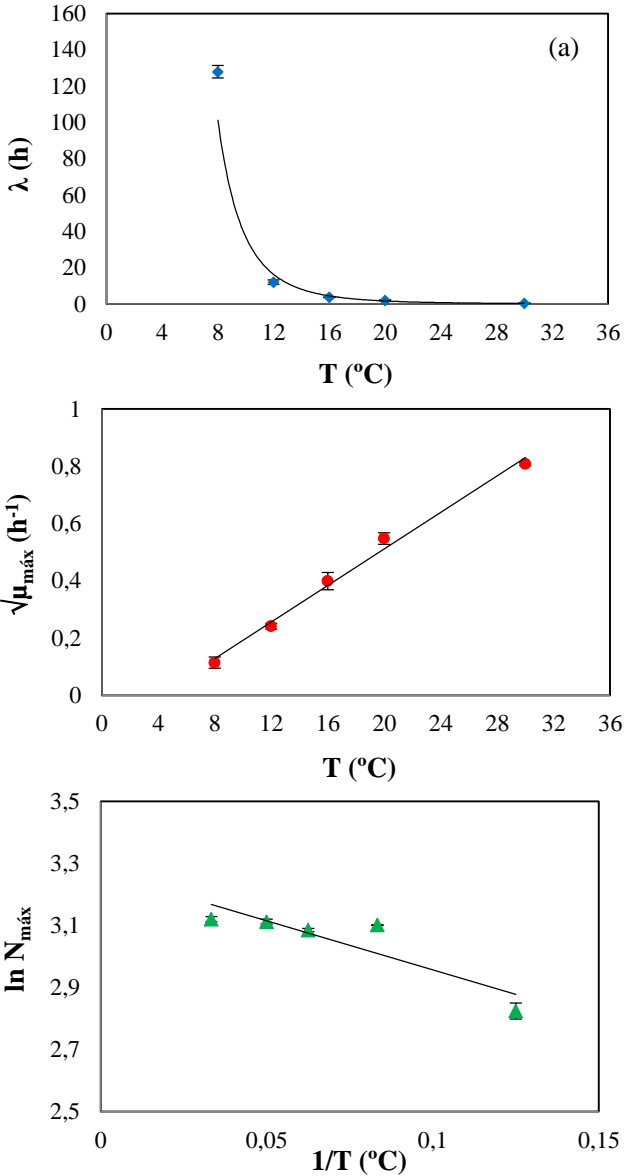


Figura 14 - Modelos secundários que descrevem o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento (●) $\mu_{\text{máx}}$ (a) e (▲) $N_{\text{máx}}$ (b) para *W. viridescens*. A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado.

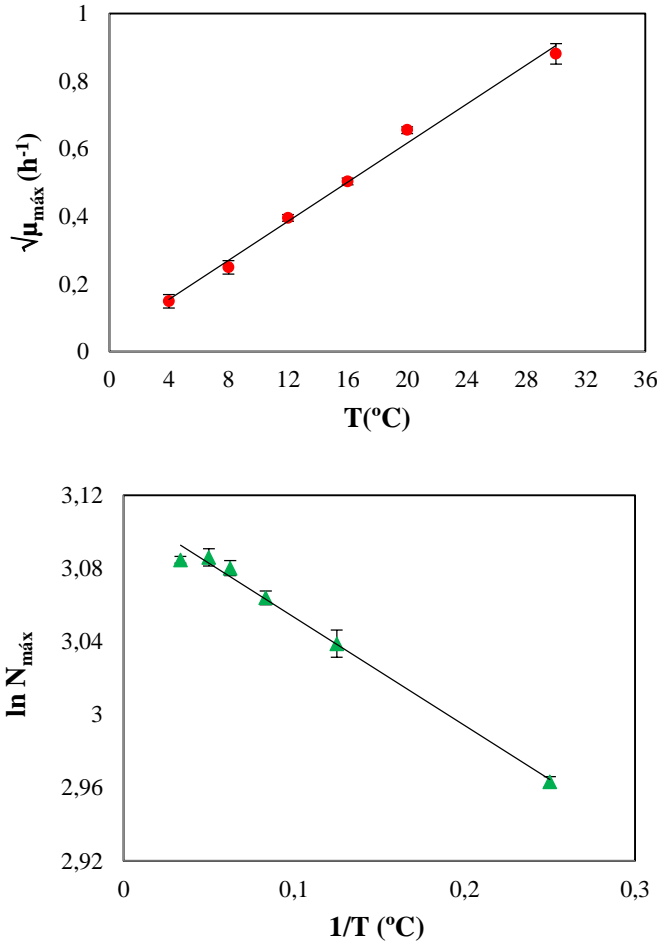
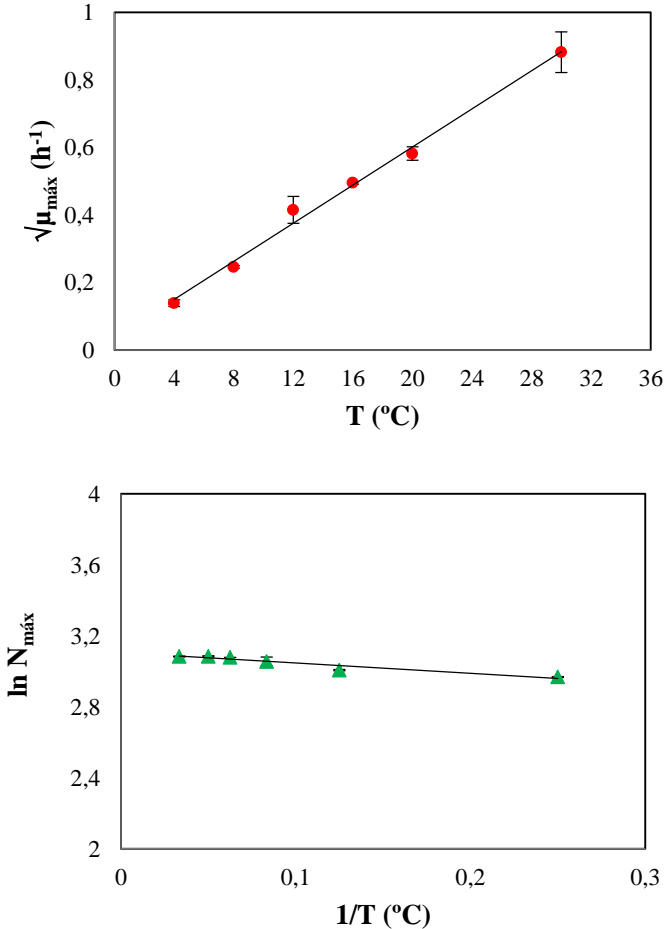


Figura 15 - Modelos secundários que descrevem o efeito da temperatura nos parâmetros de crescimento (●) $\mu_{\text{máx}}$ (a) e (▲) $N_{\text{máx}}$ (b) para *L. sakei*. A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado.



Na Figura 13c, observa-se que o resultado apresentado pelo parâmetro $N_{\text{máx}}$, de *L. plantarum* na temperatura de 8 °C, foi menor do que os outros valores determinados para o este mesmo parâmetro nas demais temperaturas de cultivo, justificando o baixo valor do coeficiente de correlação apresentado por este parâmetro na Tabela 4.

Os parâmetros de crescimento microbiano duração da fase lag e

estado fisiológico das células, definido como o produto da fase lag com a velocidade específica máxima de crescimento, estão relacionados com a vida útil dos alimentos (PIN et al., 2002; SWINNEN et al., 2004; LONGHI et al., 2013). Sendo que, qualquer alteração ocorrida nestes parâmetros de crescimento causada pela variação na temperatura de incubação vai interferir na determinação da vida útil, ou seja, na determinação do tempo necessário para que a concentração de BAL atinja 10^7 UFC.mL⁻¹.

O limite microbiológico para BAL estabelecido para o final da vida útil de produtos refrigerados à base de carne é de 10^7 UFC.g⁻¹ (SLONGO et al., 2009; DALCANTON et al., 2013). O tempo para que a concentração de BAL atinja 10^7 UFC.mL⁻¹, definido como sendo relativo à Vida Útil (VU) do alimento em que estas bactérias poderiam estar presentes, foi obtido pelo ajuste do modelo de BAR às curvas de crescimento de *L. plantarum*, sendo de aproximadamente 673, 140, 53, 27 e 13 h para as temperaturas de incubação de 8, 12, 16, 20 e 30 °C, respectivamente. Para *L. viridescens*, o VU foi de aproximadamente 653, 144, 51, 31, 22 e 12 h para as temperaturas de incubação de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C, respectivamente e para *L. sakei* o VU foi de aproximadamente 476, 146, 53, 31, 21 e 13 h, para as temperaturas de incubação de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C, respectivamente.

De acordo com a análise dos valores obtidos para o VU de cada BAL, é importante enfatizar a necessidade de um controle das temperaturas de armazenamento dos produtos cárneos, pois o abuso de temperatura colabora com o desenvolvimento e multiplicação das BAL, que são as principais bactérias deteriorantes das carnes e produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada.

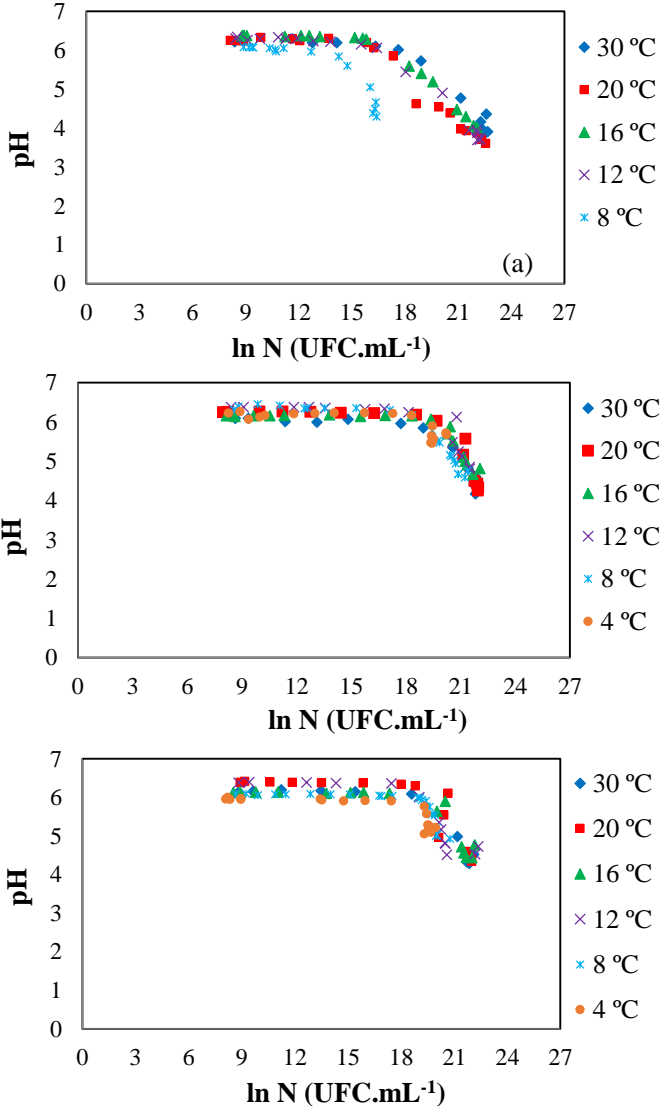
2.2.3 pH das BAL

O ácido láctico produzido pelas BAL durante o crescimento pode reduzir o pH do meio no qual elas estão inseridas. Manios, Lambert e Skandamis (2014) verificaram pela análise por cromatografia líquida de alta performance que a produção de ácido láctico é o principal responsável pelo aumento da acidez das emulsões ácidas a base de vegetais causada por *L. plantarum* e *L. brevis*. A variação do pH também pode estar associada à deterioração dos produtos cárneos. Com isso, foi analisado o acompanhamento da variação do pH, de cada BAL em estudo, em função do tempo (h) durante o crescimento bacteriano nas diferentes temperaturas de incubação testadas.

A Figura 16 mostra a variação do pH ao longo do crescimento das

BAL, *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, nas temperaturas de incubação de 4, 8, 12, 16, 20 e 30 °C.

Figura 16 - Acompanhamento da variação do pH ao longo do crescimento de *L. plantarum* (a), *W. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) nas diferentes temperaturas de incubação.



Como pode ser observado na Figura 16a, houve um decréscimo nos valores de pH, ou seja, um aumento da concentração de ácido láctico quando a concentração celular de *L. plantarum* atingiu valores de 7 log UFC.mL⁻¹ (17 ln UFC.mL⁻¹) para as temperaturas de 30, 20, 16 e 12 °C e para a temperatura de 8 °C a concentração celular foi de 6 log UFC.mL⁻¹ (14 ln UFC.mL⁻¹). Para *W. viridescens* e *L. sakei* os valores de pH começaram a decrescer quando a concentração celular atingiu valores de 8 log UFC.mL⁻¹ (Figura 16b e 16c).

Estes resultados demonstram que até a concentração atingir 7 log UFC.mL⁻¹ (17 ln UFC.mL⁻¹) não houve alteração de pH para as três BAL, exceto para *L. plantarum* na temperatura de 8 °C, na qual ocorreu uma importante variação do pH quando a concentração foi em torno de 6 log UFC.mL⁻¹ (14 ln UFC.mL⁻¹). Estes resultados indicam que as principais alterações resultantes do crescimento de BAL podem ocorrer após a concentração de 7 log UFC.mL⁻¹, considerada como final da vida útil de produtos em que as BAL são as principais deteriorantes.

Resultados semelhantes também foram observados por Ruiz-Capillas, Carballo e Colmenero (2007), Slongo et al. (2009), Kreyenschmidt et al. (2010) e Dalcanton et al. (2013), que verificaram que o pH permanece constante até a concentração celular das BAL atingir valores de aproximadamente 7 log UFC g⁻¹.

2.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

O modelo de BAR foi escolhido para a definição dos parâmetros de crescimento das BAL nas diferentes temperaturas de incubação estudadas.

De acordo com os modelos secundários obtidos, foi possível prever os parâmetros de crescimento das BAL dentro da faixa de temperatura estudada (de 4 °C a 30 °C).

O crescimento das BAL é fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento, mesmo sob condições de refrigeração.

2.4 REFERÊNCIAS

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

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 261-277, 2004.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. **Food Microbiology**, v. 22, p. 505-512, 2005.

CHORIN, E.; THUAULT, D.; CLÉRET, J-J.; BOURGEOIS, C-M. Modelling *Bacillus cereus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 229-234, 1997.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. 2010. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2010.

DALCANTON, F.; PEREZ-RODRIGUEZ, 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 Microbiology**, v. 48, p. 2580-2587, 2013.

FRANCOIS, K.; DEVLIEGHIERE, F.; STANDAERT, A.R.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F.; DEBEVERE, J. Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 26–30, 2003.

FRANCOIS, K.; DEVLIEGHIERE, F.; STANDAERT, A. R.; GEERAERD, A. H.; COOLS, I.; VAN IMPE, J. F.; DEBEVERE, J. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1503-1515, 2005.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P. Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresentado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados à Vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 1, p. 113-133, 2013.

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

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

HUDSON, J. A.; MOTT, S. J. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. **Journal of Food Safety**, v. 14, p. 329-339, 1994.

KREYENSCHMIDT, J.; HÜBNER, 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.

LI, M. Y.; SUN, X. M.; ZHAO, G. M.; HUANG, X. Q.; ZHANG, J. W.; TIAN, W.; ZHANG, Q. H.. Comparison of mathematical models of lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged raw beef stored at different temperatures. **Journal of Food Science**, v. 78, i. 4, p. M600-M604, 2013.

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. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 88-96, 2013.

MANIOS, S. G.; LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N. A generic model for spoilage of acidic emulsified foods: Combining physicochemical data, diversity and levels of specific spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 1-11, 2014.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2006. 258 p.

PIN, C.; GARCÍA DE FERNANDO, G. D.; ORDÓÑEZ, J. A.; BARANYI, J. Analysing the lag-growth rate relationship of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 197-201, 2002.

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

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

RUIZ-CAPILLAS, C.; CARBALLO, J.; COLMENERO, F. J. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. **Meat Science**, v. 75, p. 397-405, 2007.

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

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

CAPÍTULO 3

3 MODELAGEM DA CULTURA MISTA DAS BAL *L. plantarum*, *W. viridescens* E *L. sakei*.

Após a realização dos estudos de cultivo isotérmico das culturas puras de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, foram realizados cultivos utilizando dois tipos de cultura mista das BAL, nas temperaturas de incubação de 20 e 30 °C, para estudar como estas BAL se comportam quando estão inseridas no mesmo meio. Foram estudadas temperaturas de incubação próximas à temperatura ambiente, pelo fato de serem experimentos mais rápidos.

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Centro Tecnológico (CTC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Bactérias

As cepas das BAL utilizadas foram descritas no item 1.1.1 do Capítulo 1.

3.1.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito no item 1.1.2 do Capítulo 1.

3.1.3 Condições de crescimento da cultura mista

Foram testados dois tipos de cultura mista, uma delas com as três BAL (CM 1) e a outra contendo somente *W. viridescens* e *L. sakei* (CM 2). A bactéria *L. plantarum* foi retirada da CM 2 por escolha aleatória. Os experimentos isotérmicos da cultura mista das BAL foram realizados em frascos de 500 mL, com volume útil de 320 mL de caldo MRS e com 1 % (v/v) de inóculo associados na proporção 1:1:1 de cada BAL para CM 1 e na proporção de 1:1 para CM 2. A concentração inicial dos experimentos de CM 1 e CM 2 foi de aproximadamente 10^3 UFC.mL⁻¹ e o pH inicial do meio de cultivo se manteve em torno de 6,0. Os frascos foram incubados em estufa em duas diferentes temperaturas de incubação,

20 e 30 °C para CM 1 e somente na temperatura de 30 °C para CM 2 e as curvas de crescimento foram acompanhadas até a fase estacionária. Os experimentos foram conduzidos em um único dia gerando duplicata de erlenmeyers, e a temperatura mantida dentro das estufas de incubação foi registrada por um *datalogger* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha), com registro de temperatura a cada 5 minutos.

3.1.4 Amostragem da cultura mista para plaqueamento e absorbância

O acompanhamento das curvas de crescimento das culturas mistas foi realizado utilizando o método de contagem de células viáveis em placas em intervalos de tempo preestabelecidos. O plaqueamento por profundidade foi realizado como descrito no item 1.1.2 do Capítulo 1. Simultaneamente, utilizou-se o método de medida de absorbância (abs) para acompanhamento da construção da curva de crescimento. Foram coletados, assepticamente em câmara de fluxo laminar, 2 mL da cultura mista para as leituras de abs em espectrofotômetro em intervalos de tempo preestabelecidos, dependendo da temperatura de incubação (20 e 30 °C). As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 600 nm. O acompanhamento do pH foi feito para os dois tipos de cultura mista das BAL nas temperaturas de incubação estudadas, juntamente com a coleta das medidas de abs e o plaqueamento.

3.1.5 Modelagem do crescimento da cultura mista

O ajuste dos modelos primários de BAR (BARANYI e ROBERTS, 1994) e GO (GIBSON, BRATCHELL, ROBERTS, 1987) às curvas de crescimento das culturas mistas das BAL foi realizado conforme o item 2.2.2 da Revisão da Literatura. A comparação estatística do ajuste dos modelos primários utilizando os índices estatísticos R^2 , MSE, fator bias e fator de exatidão foi realizada conforme descrito no item 2.6 da Revisão da Literatura.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Ajuste dos modelos primários às curvas de crescimento isotérmico das culturas mistas

A modelagem do crescimento isotérmico das culturas mistas das BAL foi um estudo anterior aos experimentos realizados com o uso da técnica molecular de qPCR.

Muitos trabalhos existentes na literatura estudam o comportamento das BAL presentes em culturas mistas (ADAMBERG et al., 2003; CHEIRSILP et al., 2003; JANSSEN et al., 2006; ANTWI et al., 2007; CHEIRSILP; SHIMIZU; SHIOYA, 2007; ALTIERI et al., 2008; THEVENARD et al.; 2011). Nestes trabalhos são avaliados aspectos como a influência das BAL com outros tipos de microrganismos, muitas vezes patogênicos. Entretanto, estudos do comportamento de culturas mistas com três microrganismos deteriorantes da mesma espécie, sendo três BAL, não são encontrados na literatura e são importantes para se definir, de forma mais real, a estimativa da vida útil de produtos cárneos.

A avaliação do comportamento das BAL dentro de uma cultura mista pode ser influenciada pela ação inibitória destas bactérias sobre diferentes grupos de microrganismos (HELANDER; VON WRIGHT; MATTILA-SANDHOLM, 1997). Algumas BAL produzem substâncias com ação inibitória, entre elas destacam-se a produção de bacteriocinas que são agentes antimicrobianos que tem a capacidade de inibir ou reduzir a contaminação causada por microrganismos deteriorantes e patogênicos. No entanto, a eficiência dos agentes antimicrobianos depende de inúmeros fatores como temperatura, pH, atividade de água e da concentração microbiana inicial. Mediante isto, ocorre a necessidade de estudar as interações ocorridas entre as BAL presentes na cultura mista, e a influência sobre a vida útil dos produtos cárneos.

Dois tipos de cultura mista foram estudados, sendo uma cultura mista composta pela mistura das cepas de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* denominada de CM 1, que foi avaliada nas temperaturas de incubação de 20 e 30 °C, e outra cultura mista formada pela mistura das cepas de *W. viridescens* e *L. sakei* denominada de CM 2, que foi avaliada na temperatura de incubação de 30 °C. As curvas de crescimento de CM 1 e CM 2 foram construídas utilizando o método de contagem de células viáveis por plaqueamento em função do tempo e concentração inicial de inóculo de 10^3 UFC.mL⁻¹. O uso isolado do método de medida de absorbância não foi possível pelo fato deste não detectar concentrações celulares baixas, sendo o limite de detecção do método de 10^6 -

10^7 UFC.mL⁻¹ e o método de contagem de células viáveis por plaqueamento quantificou as BAL presentes na cultura mista sem a possibilidade de identificar, individualmente, a cinética de crescimento de cada uma das BAL.

A Tabela 6 apresenta os índices estatísticos MSE, fator bias, fator de exatidão e R² dos ajustes dos modelos de BAR e GO às curvas de crescimento da CM 1 e CM 2 nas temperaturas de incubação de 20 e 30 °C.

Tabela 6 - Comparação dos índices estatísticos calculados para os modelos primários de BAR e GO ajustados às curvas de crescimento da CM 1 e CM 2 nas temperaturas de incubação de 20 e 30 °C.

| Índices | Modelos | CM 1 (20 °C) | CM 1 (30 °C) | CM 2 (30 °C) |
|----------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| MSE | BAR | 0,514 | 0,110 | 0,111 |
| | GO | 0,483 | 0,093 | 0,135 |
| Bias | BAR | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| | GO | 1,001 | 1,001 | 1,000 |
| Exatidão | BAR | 1,032 | 1,013 | 1,014 |
| | GO | 1,034 | 1,013 | 1,018 |
| R² | BAR | 0,987 | 0,998 | 0,997 |
| | GO | 0,987 | 0,997 | 0,997 |

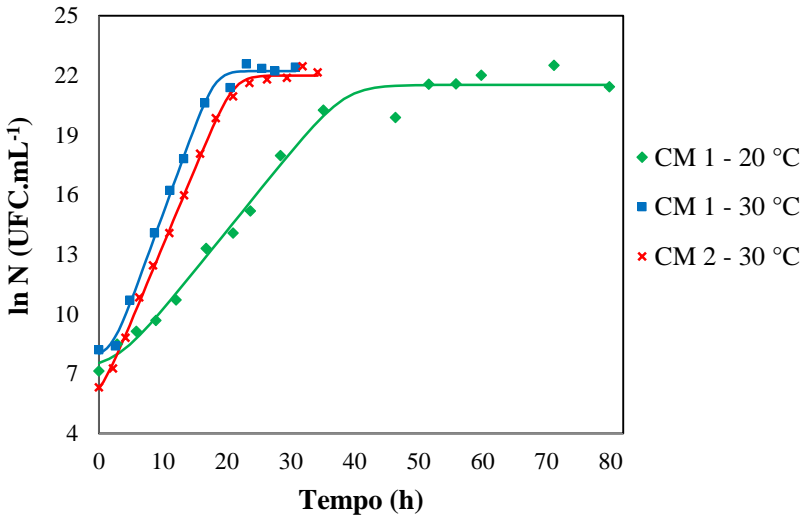
De acordo com a análise dos índices estatísticos (MSE, bias, exatidão e R²), os dois modelos primários avaliados (BAR e GO) apresentaram um bom ajuste às curvas de crescimento de CM 1 e CM 2 nas duas temperaturas de incubação. No entanto, os valores destes índices foram ligeiramente melhores para o modelo de BAR. Sendo assim, o modelo de BAR foi escolhido para a definição dos parâmetros de crescimento das duas culturas mistas em estudo (Tabela 7). O ajuste deste modelo às curvas de crescimento é apresentado na Figura 17. Para facilitar a visualização, cada temperatura foi representada por somente uma das duplicatas de cada experimento.

Tabela 7 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts às curvas de crescimento de culturas mistas (CM 1 e CM 2) nas temperaturas de 20 e 30 °C.

| Cultura mista (CM) | Parâmetros de crescimento – BAR | | |
|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|
| | λ (h) | μ_{\max} (h ⁻¹) | N_{\max}^* |
| CM 1 (20 °C) | 2,75 | 0,389 | 21,92 |
| CM 1 (30 °C) | 2,03 | 0,854 | 22,35 |
| CM 2 (30 °C) | 0,63 | 0,763 | 22,29 |

* N_{\max} é a população máxima atingida expressa em ln UFC.mL⁻¹

Figura 17 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento da CM1 e CM2 em diferentes temperaturas.

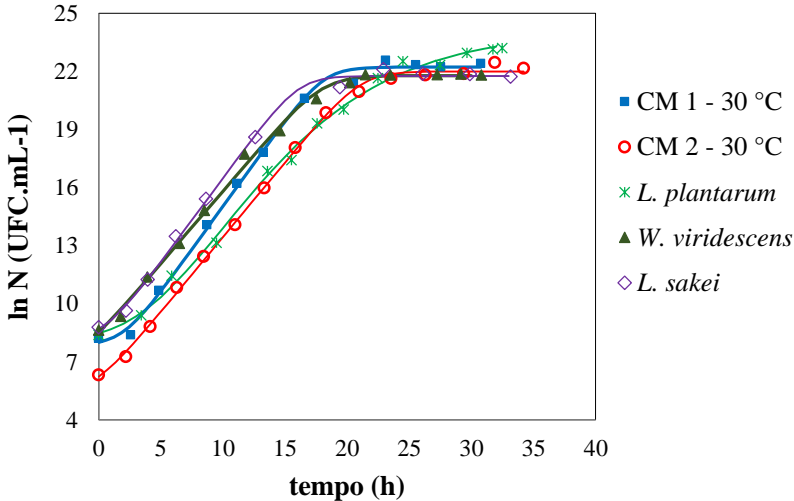


Os resultados da Tabela 7 demonstraram que a duração da fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento são influenciadas pela variação da temperatura de incubação e do tipo de cultura mista utilizado, no entanto não ocorre alteração na população máxima atingida. Com a diminuição da temperatura de incubação da cultura CM 1, houve um decréscimo na velocidade específica máxima de crescimento e um aumento na duração da fase lag. Quando se comparam as culturas CM 1 e CM 2, ambas cultivadas à temperatura de 30 °C, observa-se que a duração da fase lag é bem menor para a CM 2, ou seja, a retirada de *L. plantarum* da cultura mista pode ter influenciado na duração da fase

lag e na velocidade específica máxima de crescimento (Figura 17).

A partir disto, o crescimento das culturas puras das três BAL foi comparado com o crescimento da CM 1 e da CM 2 na temperatura de incubação de 30 °C, incluindo o ajuste do modelo de BAR à estas curvas crescimento, como mostra a Figura 18. Para facilitar a visualização, cada temperatura foi representada por somente uma das duplicatas de cada experimento.

Figura 18 – Comparação do crescimento das culturas puras de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* com o crescimento da CM 1 e da CM 2 (símbolos) na temperatura de incubação de 30 °C, incluindo o ajuste do modelo de BAR (linha contínua).



Para facilitar esta comparação da Figura 18, foram demonstrados os parâmetros de crescimento λ , $\mu_{\text{máx}}$ e $N_{\text{máx}}$ das curvas de crescimento definidos pelo modelo de BAR, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts às curvas de crescimento das culturas puras das três BAL e culturas mistas (CM 1 e CM 2) na temperatura de 30 °C.

| Cultura mista (CM) | Parâmetros de crescimento – BAR | | |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| | λ (h) | $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹) | $N_{\text{máx}}^*$ |
| CM 1 (30 °C) | 2,0 | 0,854 | 22,3 |
| CM 2 (30 °C) | 0,6 | 0,763 | 22,3 |
| <i>L. plantarum</i> | 0,3 | 0,650 | 22,7 |
| <i>W. viridescens</i> | 0,0 | 0,780 | 21,9 |
| <i>L. sakei</i> | 0,0 | 0,780 | 21,9 |

* $N_{\text{máx}}$ é a população máxima atingida expressa em ln UFC.mL⁻¹

Os microrganismos presentes em uma cultura mista podem apresentar interações que inibem ou estimulam o crescimento microbiano, os resultados da Figura 18 e Tabela 8 demonstram que, a presença de *L. plantarum* na cultura mista (CM 1) colabora com o aumento da duração da fase lag, aumento da velocidade específica máxima de crescimento e, novamente, não ocorre alteração na população máxima atingida. Mediante isto, existe a possibilidade desta bactéria estar estimulando o rápido crescimento das outras duas BAL quando presentes na cultura mista. Outros exemplos de interações entre as BAL foram descritos por GARRO; VALDEZA; GIORI, (2004), quando verificaram que as interações entre as diferentes cepas de BAL podem estimular o crescimento de uma cultura mista nos estudos sobre a influência da temperatura no crescimento de culturas puras e mistas de *Bifidobacterium longum* CRL 849 e *Lactobacillus fermentum* CRL 251 no leite de soja; e por Fadda et al. (2002) quando relataram que a interação ocorrida entre as cepas de *L. plantarum* e *L. casei* de uma cultura mista melhoram o processo de fermentação de produtos à base de carne.

A cultura pura de *L. plantarum* tem um crescimento global mais lento ($\mu_{\text{máx}} = 0,650$) que *W. viridescens* ($\mu_{\text{máx}} = 0,780$) e *L. sakei* ($\mu_{\text{máx}} = 0,780$), apesar disso a bactéria *L. plantarum* não causou atraso no crescimento das outras BAL, quando se analisa o comportamento de CM 1 em relação à CM 2 na temperatura de incubação de 30 °C. Esta influência de *L. plantarum* no crescimento das outras duas bactérias não pode ser identificada pela técnica de plaqueamento, no entanto o uso das técnicas moleculares permite a identificação, caracterização e quantificação individual de cada cepa existente em uma cultura mista.

3.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

O modelo de BAR foi escolhido para a definição dos parâmetros de crescimento das culturas mistas CM 1 e CM 2 nas diferentes temperaturas de incubação estudadas.

A comparação feita entre as culturas puras de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, e as diferentes culturas mistas, CM 1 e CM 2, demonstrou que a retirada de *L. plantarum* da cultura mista influenciou a duração da fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento devido as interações microbianas ocorridas.

A identificação das cepas das BAL na cultura mista e das possíveis interações microbianas ocorridas não é possível com o uso do método de plaqueamento, pois as BAL pertencem ao mesmo gênero.

O uso de técnicas moleculares, como a qPCR, torna-se uma alternativa para a identificação, caracterização e quantificação individual de cada cepa existente em uma cultura mista.

3.4 REFERÊNCIAS

ADAMBERG, K.; KASK, S.; LAHT, T-M.; PAALME, T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 171-183, 2003.

ALTIERI, C.; BEVILACQUA, A.; D'AMATO, D.; DEL NOBILE, M.A.; SINIGAGLIA, M. Modelling the survival of starter lactic acid bacteria and *Bifidobacterium bifidum* in single and simultaneous cultures. **Food Microbiology**, v. 25, p. 729-734, 2008.

ANTWI, M.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J. F.; GEERARERD, A. H. Modelling the combined effect of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactics* growth in mono- and coculture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 71-84, 2007.

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

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Kinetic modeling of kefiran production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 570-579, 2007.

CHEIRSILP, B.; SHOJI, H.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for Kefiran Production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 279-284, 2003.

FADDA, S.; OLIVER, G.; VIGNOLO, G. Protein Degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a Sausage Model System. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 3, p. 1179-1183, 2002.

GARRO, M. S.; VALDEZA, G. F.; GIORI, G. S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in purê and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v. 21, p. 511-518, 2004.

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

HELANDER, I. M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 146-150, 1997.

JANSSEN, M.; GEERAERD, A. H.; LOGIST, F.; DE VISSCHER, Y.; VERECKEN, K. M.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F.; VAN IMPE, J. F. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 59-72, 2006.

THEVENARD, B.; RASOAVA, N.; FOURCASSIÉ, P.; MONNET, V.; BOYAVAL, P.; RUL, F. Characterization of *Streptococcus thermophilus* two-component systems: In silico analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in pure or mixed culture with its yogurt partner, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 151, n. 2, p. 171-181, 2011.

CAPÍTULO 4

4 USO DA TÉCNICA DE qPCR NA CARACTERIZAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS BAL *L. plantarum*, *W. viridescens* E *L. sakei*.

A caracterização, detecção e quantificação de cada uma das três BAL presentes na cultura mista pela utilização dos métodos de medida de absorvância e contagem de células viáveis é impossível devido ao fato destas apresentarem a mesma morfologia, fornecendo resultados idênticos frente aos resultados de ambos os métodos de quantificação. Mediante isto, o uso da qPCR é uma alternativa para a diferenciação entre as cepas, permitindo a construção das curvas de crescimento, individuais, e futuramente da cultura mista em estudo.

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Centro Tecnológico (CTC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Microbiologia de Solos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Bactérias

As cepas das BAL utilizadas foram descritas no item 1.1.1 do Capítulo 1.

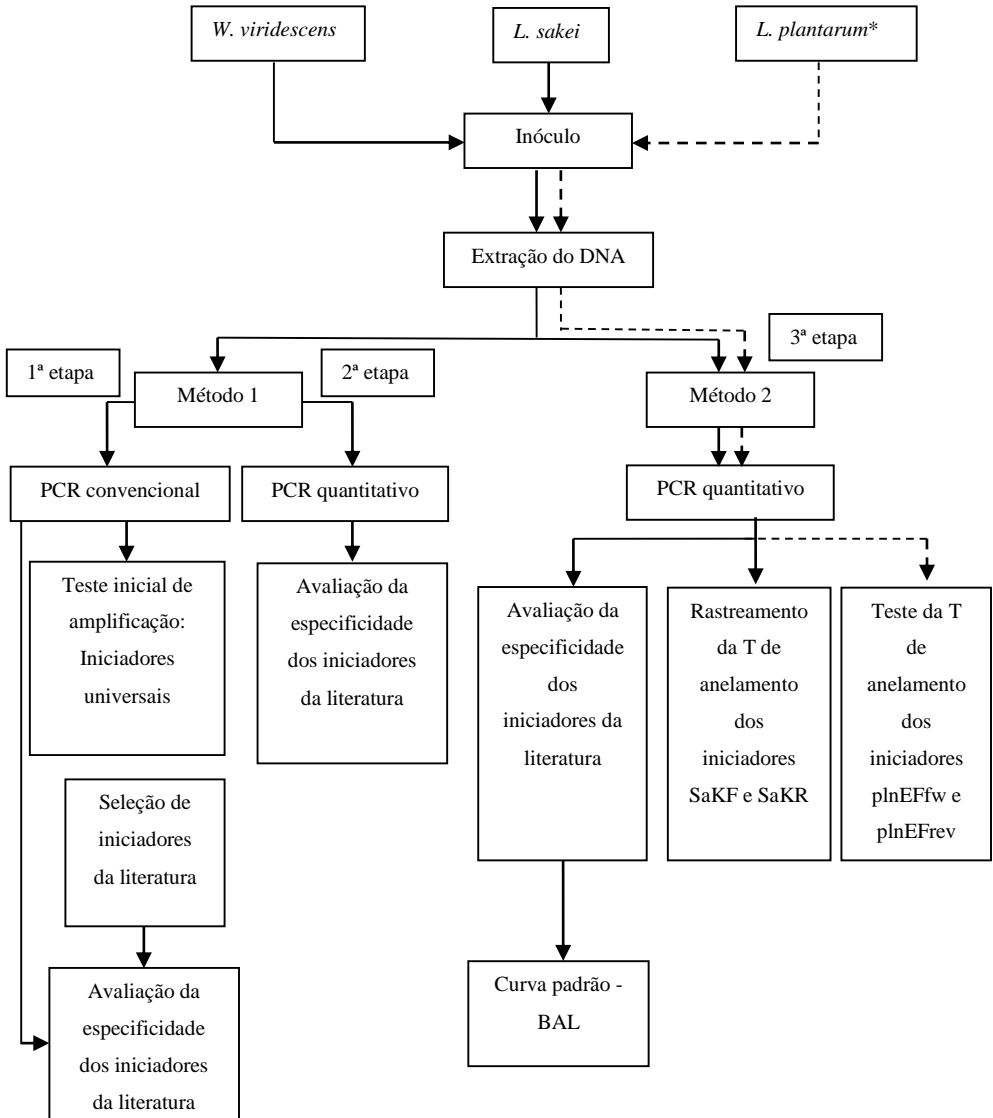
4.1.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito no item 1.1.2 do Capítulo 1.

4.1.3 Coleta de amostras e aplicação das técnicas moleculares

A Figura 19 apresenta um fluxograma com as etapas utilizadas na análise de qPCR das BAL presentes na cultura mista.

Figura 19 - Fluxograma das etapas de caracterização, detecção e quantificação das BAL através do uso de técnicas moleculares.



*A linha pontilhada indica que o teste da temperatura de anelamento utilizando o par de iniciadores plnEFfw e plnEFrev foi realizado somente para *L. plantarum*.

Foram coletadas, em câmara de fluxo laminar (Veco - Bioprotector Plus - 12, Campinas, Brasil), amostras de 10 mL do inóculo das culturas puras das BAL após 18 h de incubação na temperatura de 30 °C (*L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*) e em seguida foram armazenadas em tubos de ensaio e estocadas sob refrigeração (± 5 °C) para posterior utilização. Os experimentos foram realizados em duplicata e as três BAL encontravam-se na concentração celular máxima de 10^9 UFC.mL⁻¹, após o período de incubação de 18 h. Algumas amostras contendo 50 mL de inóculo, de cada uma das BAL em estudo, foram estocadas em frascos de polipropileno com tampa de rosca e armazenadas em freezer a - 24 °C para análises futuras.

A seguir serão descritas detalhadamente as etapas do fluxograma apresentado na Figura 19.

4.1.4 Etapas do Fluxograma

4.1.4.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi feita nas amostras de inóculo coletadas de cada uma das BAL em estudo. Foram testados dois métodos de extração de DNA para as culturas puras das BAL: (1) Extração do DNA de isolados pela técnica de lise térmica (HAGEN et al., 2002) e (2) Extração de DNA pelo método de clorofórmio e álcool isoamílico.

No método (1), adicionou-se 1,5 mL de inóculo de cada uma das BAL em microtubos de polipropileno (Axygen, Califórnia, Estados Unidos) e em seguida estes microtubos foram centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos (Spinlab SL-2000, Ribeirão Preto, Brasil). Estes microtubos estavam livres de dnases para evitar a degradação do DNA extraído. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada nos *pellets* formados. Após os tubos foram aquecidos em termociclador (Eppendorf Mastercycler, Hamburg, Alemanha) a 100 °C por 5 minutos para promover a lise das células. Os microtubos foram novamente centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos, para separação de restos celulares mais densos que o DNA e outras moléculas, e os sobrenadantes contendo o DNA foram transferidos para novos microtubos de polipropileno e então armazenados a -20 °C.

O método (2) é composto de duas etapas: na etapa de lise da amostra, adicionou-se 1,5 mL de inóculo de cada uma das BAL em microtubos de polipropileno (Axygen, Califórnia, Estados Unidos) e então centrifugou-se os microtubos a 12000 rpm por 5 minutos.

Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi suspenso em 200 µL de tampão de lise (Anexo I) sendo em seguida macerado, no próprio microtubo, até completa dissolução. Após completou-se o volume com mais 400 µL de tampão de lise, totalizando 600 µL de tampão. Neste volume adicionou-se 1,2 µL de β-mercaptoetanol (C₂H₆OS) 0,2 % (v/v) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Esta mistura foi delicadamente homogeneizada por 5 segundos e após, as amostras foram submetidas ao resfriamento na temperatura de aproximadamente 5 °C por 10 minutos e imediatamente colocados em banho maria a 65 °C por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Por fim as amostras foram deixadas em banho maria a 65 °C por 1 h.

Na etapa de extração do DNA, foi adicionado aos microtubos, que estavam incubados por 1 h, um volume de clorofórmio:álcool na proporção de 24:1, misturou-se com cuidado por inversão durante 5 minutos e em seguida centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi removida sendo que este volume foi medido e transferido para novos microtubos. O volume removido da fase aquosa foi padronizado para todas as amostras, ou seja, foi retirado o mesmo volume em todas as amostras analisadas. Após adicionou-se o mesmo volume de isopropanol resfriado (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) invertendo cuidadosamente várias vezes. Em seguida, os microtubos foram incubados a -20 °C por 24 h. As amostras foram então centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 500 µL de etanol 70 % resfriado (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) (Anexo I), e logo após as amostras foram agitadas por inversão. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Nos casos em que houve excesso de sobrenadante nos *pellets*, esse foi eliminado invertendo os microtubos em papel toalha por 20 minutos na câmara de fluxo laminar. Por fim, o *pellet* foi suspenso em 50 µL de água ultrapura esterilizada e armazenado sob refrigeração.

4.1.4.2 Teste inicial de amplificação utilizando iniciador universal de bactérias

O DNA extraído do inóculo de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* foi submetido a um teste inicial utilizando a técnica de PCR convencional, visando avaliar se a qualidade do DNA extraído foi suficiente para amplificação das amostras. Este teste baseou-se em amplificar as amostras de DNA por 30 ciclos em termociclador,

utilizando-se um par de iniciadores universal de bactérias BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A extração do DNA utilizada foi segundo a técnica de lise térmica (HAGEN et al., 2002).

As condições do teste foram conduzidas da seguinte maneira: 1 µL de cada amostra de DNA extraído das BAL foi adicionado a uma mistura que totalizava 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR, 2,5 µL de dNTP, 0,75 µL de MgCl₂, 0,25 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL de cada iniciador e 16 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. A amplificação foi realizada com a seguinte programação: 95 °C por 5 minutos, após 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

As amplificações das cadeias de DNA foram reveladas através da técnica de eletroforese em gel baseada no método de Kostinek et al. (2005) sendo utilizado o gel de agarose. O gel de agarose foi preparado diluindo 0,5 g de agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em 50 mL de solução tampão de tris acetato EDTA (TAE 1x) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), sob aquecimento em microondas (por aproximadamente 1 minuto na potência máxima até que o gel ficasse transparente, evitando a fervura da solução) a fim de que os polímeros formassem a gelatina. Após o gel esfriar, ele foi derramado na cuba de eletroforese, para a formação dos poços onde seriam adicionadas as amostras, colocou-se um pente e esperou-se o endurecimento deste gel por aproximadamente 30 minutos. A cuba eletrolítica foi ligada a dois pólos a fim de criar uma diferença de potencial. O DNA por ter carga negativa migra do eletrodo negativo para a região do eletrodo positivo da eletroforese e os fragmentos são separados de acordo com o tamanho. As amostras foram preparadas através de uma mistura de 4 µL de DNA, 2 µL de *loading*, 2 µL de *SYBR Green* e 2 µL de marcador de bandas. O *loading* é composto por dois corantes indicadores: o azul de bromotimol e o xileno cianol, e tem o objetivo de verificar o quanto que a molécula de DNA migrou no gel. O marcador de bandas é constituído pela mistura do corante *SYBR Green* com o *loading*.

A cuba de eletroforese foi submetida a uma tensão de 80 V por aproximadamente 30 minutos e em seguida o gel fotodocumentado. A corrida do DNA no gel de agarose pode ser visualizada através do corante *SYBR Green* que se intercala com a molécula de DNA e quando exposto à luz ultravioleta emite fluorescência.

4.1.4.3 Seleção dos iniciadores

Após o teste inicial de amplificação utilizando o par de iniciadores universal de bactérias, foram selecionados os iniciadores utilizados para cada uma das BAL a partir de trabalhos da literatura na área de biologia molecular. Primeiramente os iniciadores foram avaliados *in silico* (programa FastPCR 6.3) quanto à sua especificidade, a fim de escolher o par de iniciadores mais adequado para cada uma das três BAL estudadas. Para *L. plantarum* foram escolhidos o par de iniciadores estudados por Cho et al. (2011), para *W. viridescens* foram escolhidos os iniciadores estudados por Lambais et al. (2006) e Campana (2012) e para *L. sakei* foram escolhidos o par de iniciadores estudados por Martín et al. (2006). Os iniciadores selecionados estão descritos na Tabela 9.

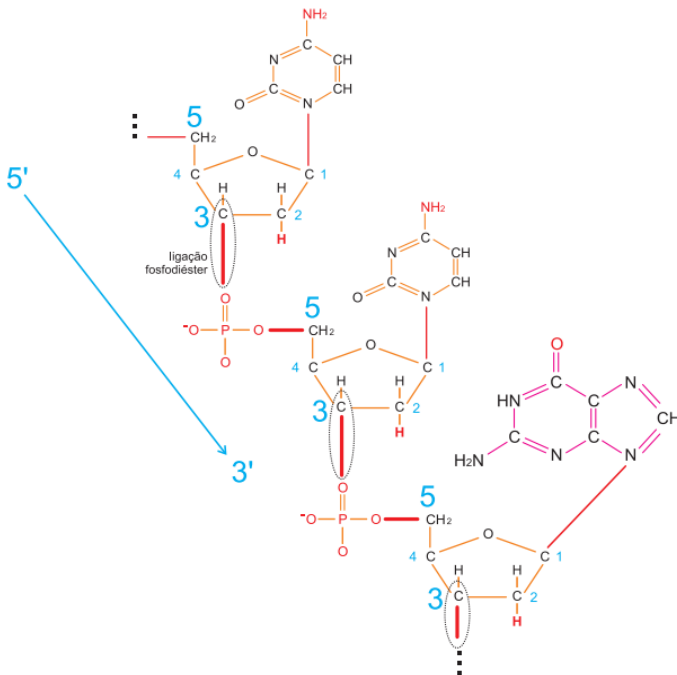
Tabela 9 - Informações gerais sobre os pares de iniciadores que foram utilizados para as três BAL presentes na cultura mista.

| BAL | Iniciadores | Sequências (5'-3') | Temperatura de anelamento |
|-----------------------|-------------|-------------------------------------|---------------------------|
| <i>L. plantarum</i> | plnEFfw | CTATTTTCAGGTG GCGTTTTTC | 54 °C |
| | plnEFrev | GTGGATGAATCC TCGGACAG | 54 °C |
| <i>W. viridescens</i> | PRBA63F | GGATCCCAGGCC TAACACATGCAA GTC | 56 °C |
| | Wsla-179-R | CAARTGTTATCC CCTGCTAAG | 56 °C |
| <i>L. sakei</i> | SakF | GATAAGCGTGAG GTCGATGGTT | 50 °C |
| | SakR | GAGCTAATCCCC CATAATGAAACT AT | 50 °C |

A Tabela 9 mostra as temperaturas de anelamento de cada par de iniciadores utilizado para a amplificação do DNA das BAL, ou seja, é a temperatura na qual os iniciadores irão se unir à região complementar do DNA após a etapa de desnaturação da dupla fita do DNA. As sequências dos pares de iniciadores apresentam a nomenclatura (5' - 3') que significa a direção da formação da nova fita de DNA a partir da fita molde, como mostra a Figura 20. O grupo hidroxila do carbono 3 da pentose do

primeiro nucleotídeo se liga ao grupo fosfato ligado à hidroxila do carbono 5 da pentose do segundo nucleotídeo através de uma ligação fosfodiéster (ARRUDA JÚNIOR, 2010). A temperatura de anelamento correta para cada par de iniciadores é essencial para que a amplificação do fragmento de DNA de interesse ocorra de forma específica e sensível, ou seja, permitindo amplificar o fragmento da bactéria de interesse, mesmo quando a mesma está presente na amostra em baixas concentrações.

Figura 20 - Demonstração da direção da sequência (5' – 3') para a formação da cadeia de DNA.



Fonte: ARRUDA JÚNIOR, 2010.

4.1.4.4 Avaliação da especificidade dos iniciadores – PCR convencional

A especificidade dos iniciadores selecionados foi testada no DNA extraído do inóculo (10^9 UFC.mL⁻¹) através do método de PCR convencional, com o DNA extraído pelo método 1 (HAGEN et al., 2002). As condições utilizadas nesta técnica foram: 4 μ L da amostra de DNA

extraído de *L. plantarum* foram adicionados a uma mistura que totalizava 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR, 2,5 µL de dNTP, 0,75 µL de MgCl₂, 0,25 µL de Taq DNA polimerase, 20 pmol do iniciador plnEFFw, 18,9 pmol do iniciador plnEFrev e 5 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. A amplificação foi realizada com a seguinte programação: 95 °C por 10 minutos, após 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para *W. viridescens*, 4 µL da amostra de DNA extraído foi adicionado a uma mistura que totalizava 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR, 2,5 µL de dNTP, 0,75 µL de MgCl₂, 0,25 µL de Taq DNA polimerase, 24,6 pmol do iniciador PRBA63F, 16,1 pmol do iniciador Wsla-179-R e 2,5 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. A amplificação foi realizada com a seguinte programação: 95 °C por 10 minutos, após 60 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 63 °C por 20 segundos e 72 °C por 45 segundos, e uma extensão final de 72 °C por 45 segundos. Para *L. sakei*, 4 µL da amostra de DNA extraído foi adicionado a uma mistura que totalizava 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR, 2,5 µL de dNTP, 0,75 µL de MgCl₂, 0,25 µL de Taq DNA polimerase, 18,1 pmol do iniciador SaKF, 15,9 pmol do iniciador SaKR e 5 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. A amplificação foi realizada com a seguinte programação: 95 °C por 10 minutos, após 50 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 63 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

As amplificações das cadeias de DNA de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* foram reveladas através da técnica de eletroforese. As condições utilizadas são as mesmas descritas no item 4.1.4.2 deste capítulo.

4.1.4.5 PCR quantitativo (qPCR) - Avaliação da especificidade dos iniciadores

A especificidade dos iniciadores também foi testada através da técnica de qPCR utilizando o DNA extraído do inóculo, de cada uma das BAL, com concentração 10⁹ UFC.mL⁻¹. Foram testados os dois métodos de extração de DNA descritos no item 4.1.4.1 deste capítulo. As reações de qPCR foram realizadas no equipamento *Line Gene 9640* (Bioer, Hangzhou, China).

As condições utilizadas foram: 1 µL de cada amostra de DNA

extraído de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* foi adicionado a uma mistura que totalizava 10 µL contendo 5 µL de *SYBR MASTER MIX*, 0,2 µL de iniciador *forward*, 0,2 µL de iniciador *reverse*, 0,2 µL de *ROX* e 3,4 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. Os pares de iniciadores utilizados foram: plnEFfw e plnEFrev para *L. plantarum*, PRBA63F e Wsla-179-R para *W. viridescens* e SaKF e SaKR para *L. sakei*. A amplificação foi realizada para *L. plantarum* com a seguinte programação: 95 °C por 3 minutos, após 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos, 54 °C por 20 segundos com aquisição da fluorescência e 72 °C por 30 segundos. Para *W. viridescens* e *L. sakei* as condições de amplificação foram: 95 °C por 3 minutos, após 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 63 °C por 20 segundos com aquisição da fluorescência, e uma extensão final de 72 °C por 30 segundos.

Ao final das reações de amplificação, foram incluídas as condições para a construção da curva de *melting* conforme descrito: 65 °C por 20 segundos e 95 °C por 20 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

A temperatura de *melting* (T_m) originada em cada amplificação, pela técnica de qPCR, foi calculada automaticamente pelo programa do equipamento *Line Gene 9640*.

4.1.4.6 Testes da temperatura de anelamento – *L. plantarum*

Com o intuito de aumentar a especificidade e eficiência de amplificação para *L. plantarum*, foram avaliadas diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores utilizados (plnEFfw e plnEFrev). As reações foram realizadas no equipamento *Line Gene 9640* e as temperaturas de anelamento testadas foram 53 °C, 54 °C e 55 °C. A extração de DNA pelo método 2 foi utilizada nesta etapa com as seguintes condições: 2 µL da amostra de DNA extraído de *L. plantarum* foi adicionado a uma mistura que totalizava 10 µL contendo 5 µL de *SYBR MASTER MIX*, 0,2 µL de iniciador *forward*, 0,2 µL de iniciador *reverse*, 0,2 µL de *ROX* e 2,4 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

A amplificação para *L. plantarum* teve a seguinte programação: 95 °C por 3 minutos, após 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e temperatura de anelamento de 53, 54 ou 55 °C por 20 segundos com aquisição da fluorescência. A temperatura de anelamento de 54 °C também foi testada utilizando um tempo de 30 segundos. Ao final a curva de *melting* foi incluída com a seguinte programação: 65 °C por 20 segundos e 95 °C por 20 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

4.1.4.7 Construção da curva padrão das BAL

A otimização das condições para a construção da curva padrão foram realizadas para as três BAL. As amostras de inóculo (10^9 UFC.mL⁻¹) de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* foram preparadas da seguinte maneira: os tubos de ensaio contendo o inóculo, de cada uma das BAL separadamente, foram agitados no vórtex até completa homogeneização das amostras. Em seguida, foram feitas diluições seriadas do inóculo em tubos de ensaio com 9 mL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. Alternativamente, também foi realizada a extração do DNA de cada diluição dos inóculos (10^1 UFC.mL⁻¹ até 10^9 UFC.mL⁻¹) pelo método 2.

As reações da qPCR para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* foram otimizadas no equipamento *Line Gene 9640* utilizando uma mistura que totalizava 10 µL contendo 5 µL de *SYBR MASTER MIX*, 4 µL de DNA, 0,2 µL de iniciador *forward*, 0,2 µL de iniciador *reverse*, 0,2 µL de *ROX* e 0,4 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. Os pares de iniciadores utilizados foram: plnEFfw e plnEFrev para *L. plantarum*, 63F e Wsla-179-R para *W. viridescens* e SaKF e SaKR para *L. sakei*.

A amplificação testada teve a seguinte programação: 95 °C por 3 minutos, após 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e temperatura de anelamento de 54, 56 ou 50 °C por 20 segundos com aquisição da fluorescência para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. Ao final a curva de *melting* foi incluída com a seguinte programação: 65 °C por 20 segundos e 95 °C por 20 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 PCR convencional

Entre as diversas técnicas moleculares existentes na literatura, para amplificar o DNA extraído das BAL, foram escolhidos os métodos de PCR convencional e PCR quantitativo (qPCR). Os testes foram iniciados com o método de PCR convencional a fim de economizar os reagentes específicos da reação de qPCR.

4.2.1.1 Amplificação do DNA das BAL

Nos primeiros testes, com as culturas puras de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* foram utilizados o par de iniciadores universal para

bactérias (BA338fGC, UN518r), a fim de avaliar a qualidade do DNA obtido a partir do método de extração 1 e os iniciadores selecionados na literatura para *L. plantarum* (CHO et al., 2011), *W. viridescens* (LAMBALIS et al., 2006; CAMPANA, 2012) e *L. sakei* (MARTÍN et al., 2006) para verificar a especificidade dos iniciadores para cada uma das bactérias avaliadas.

No teste inicial de amplificação utilizando o par de iniciadores universal para bactérias verificou-se, através da visualização das bandas no gel de agarose, que *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* amplificaram com eficiência, comprovando a eficiência da extração de DNA para obtenção de DNA de qualidade, passível de amplificação. Já os resultados sobre a especificidade dos iniciadores selecionados dos trabalhos presentes na literatura para *L. plantarum* (plnEFfw e plnEFrev), *W. viridescens* (PRBA63F e Wsla-179-R) e *L. sakei* (SaKF e SaKR) não foram satisfatórios. As bandas no gel de agarose demonstraram que somente o par de iniciadores plnEFfw e plnEFrev (*L. plantarum*) foram específicos, pois amplificaram somente *L. plantarum* como era esperado, os demais pares de iniciadores escolhidos amplificaram o DNA dos inóculos de *W. viridescens* e *L. sakei*, simultaneamente (dados não mostrados).

4.2.2 PCR quantitativo (qPCR)

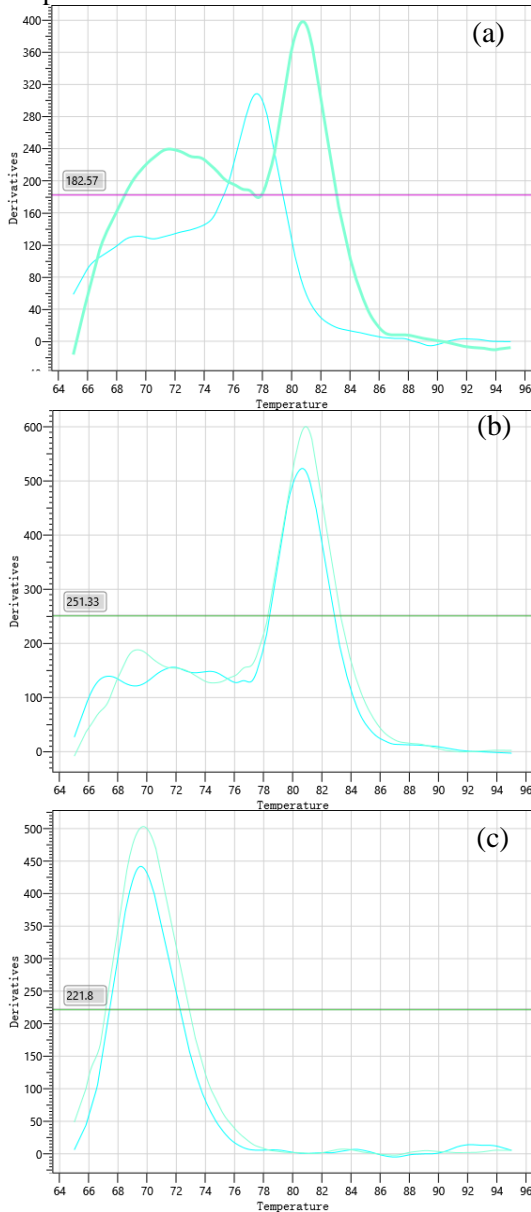
4.2.2.1 Especificidade dos iniciadores de cada BAL

A partir dos resultados originados no item anterior (4.2.1.1), pela PCR convencional, onde se observou a não especificidade dos pares de iniciadores para *W. viridescens* e *L. sakei*, foram otimizadas as condições de amplificação por qPCR para buscar o aumento da especificidade dos iniciadores selecionados. Para tanto, foram feitos testes de amplificação do DNA do inóculo de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* extraídos pelo método 1, com seus respectivos iniciadores, utilizando a técnica de qPCR. As amplificações foram analisadas pelas curvas de *melting* como mostra a Figura 21.

As curvas de *melting* podem diferenciar fragmentos de DNA de mesmo tamanho e com composição de bases nucleotídicas diferentes, gerando diferentes picos de amplificação que resultam em temperaturas de *melting* (Tm) diferentes (RIRIE; RASMUSSEN; WITTEWER, 1997). Cada etapa da qPCR (desnaturação, anelamento e extensão) tem uma temperatura ideal na qual o desempenho desta é máximo, e a temperatura de *melting* ou temperatura de pareamento é a temperatura na qual metade

das moléculas de DNA está pareada e a outra metade não está pareada, ou seja, está desnaturada (ARRUDA JÚNIOR, 2010). Quando as ampliações de uma mesma amostra gerarem T_m diferentes, pode significar contaminação da amostra com outra bactéria que possui similaridade com a bactéria que está sendo avaliada e conseqüentemente, também é amplificada, bem como reações inespecíficas a partir da formação de dímeros de iniciadores, ou seja, anelamento dos iniciadores entre si. As reações de qPCR foram representadas por duplicatas de amplificação do DNA de cada BAL.

Figura 21 - Representação das amplificações do DNA, extraído pelo método 1, das duplicatas de *L. plantarum* (a), *W. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) com seus respectivos iniciadores.



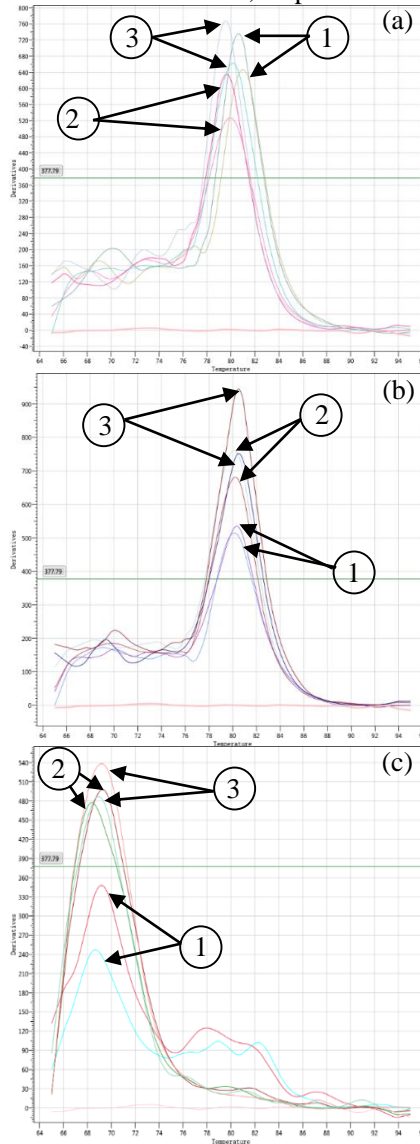
A Figura 21a mostra que, nas ampliações da duplicata do DNA do inóculo de *L. plantarum*, as curvas de *melting* apresentaram picos completamente diferentes, considerando a hipótese de formação de produtos inespecíficos na reação. Já as Figuras 21b e 21c apresentaram boas ampliações para as duplicatas do DNA dos inóculos de *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente, observando o aparecimento de um único pico na curva de *melting*, para cada uma das ampliações, sugerindo a existência de um único produto na reação. Os resultados da Figura 21 foram confirmados pelos valores das temperaturas de *melting* (T_m), originados em cada reação de qPCR, sendo 77,6 °C e 80,7 °C as T_m da duplicata de *L. plantarum*, 80,6 °C e 80,9 °C as T_m da duplicata de *W. viridescens* e 69,6 °C e 69,7 °C as T_m da duplicata de *L. sakei*.

Estes resultados demonstram a necessidade de melhoria das condições da PCR para *L. plantarum* e, alternativamente, a melhoria na qualidade do DNA pode ser uma alternativa interessante, pois picos distintos de *melting* sugerem que, durante a extração, o DNA pode ter sido fragmentado, o que levou à amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos distintos e, conseqüentemente, diferentes temperaturas de *melting*. Esse problema não foi observado para os iniciadores de *W. viridescens* e *L. sakei*, embora os mesmos tenham se mostrado ineficientes para diferenciar essas duas espécies, como apresentado no item 4.2.1.1 deste capítulo, podendo ser utilizados em experimentos com culturas puras, ou aumentar a especificidade com diferentes temperaturas de anelamento, e por isso, continuaram sendo avaliados para qPCR.

De acordo com esses resultados, o método 1 de extração do DNA não foi eficiente para *L. plantarum*, sendo necessário levar em consideração que os iniciadores utilizados para essa bactéria, amplificaram a região de DNA plasmidial (CHO et al., 2011), diferindo dos iniciadores de *L. viridescens* e *L. sakei*, os quais são específicos para regiões do rDNA 16S, o que talvez implique na necessidade de um método de extração diferenciado.

Mediante isto, foi dado seguimento aos testes de avaliação da especificidade dos iniciadores selecionados, utilizando o método de clorofórmio e álcool isoamílico (método 2) para extrair o DNA do inóculo de cada uma das BAL, seguindo as reações de qPCR como descritas para os testes feitos a partir do DNA da metodologia de extração 1 (Figura 22).

Figura 22 - Avaliação da especificidade dos pares de iniciadores plnEFfw – plnEFrev (a), PRBA63F - Wsla-179-R (b) e SaKF – SaKR (c), utilizando o DNA do inóculo de cada uma das BAL, extraído pelo método 2. O número 1, 2 e 3 representam as amplificações das duplicatas de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente.



Os resultados da Figura 22 demonstraram que os pares de iniciadores selecionados não são específicos, pois amplificaram o DNA das três BAL em estudo, simultaneamente. Até mesmo a especificidade, previamente avaliada para os iniciadores de *L. plantarum*, a partir do DNA extraído pelo método 1, não foi observada na avaliação do DNA extraído pelo método 2, possivelmente por ser um método mais eficiente de extração, o que permitiu obter DNA de maior qualidade e concentração e, conseqüentemente, detectar esse gene nas três bactérias avaliadas.

Existem trabalhos na literatura em que os iniciadores foram desenhados de acordo com a região que desejavam estudar e com isso foram feitas investigações a fim de identificar quais os táxons alvos seriam de interesse para a pesquisa (HEILIG et al., 2002; RANDAZZO et al., 2002; BYUN et al., 2004; KWON et al., 2004; QUEVEDO et al., 2011, CAMPANA, 2012). Porém os iniciadores utilizados no presente estudo foram selecionados de trabalhos da literatura (CHO et al., 2011; LAMBAIS et al., 2006; CAMPANA, 2012; MARTÍN et al., 2006), e mesmo que estes tenham sido testados *in silico*, pode acontecer dos mesmos não serem inteiramente homólogos a todas as seqüências de táxons alvo das BAL em estudo. Em seus estudos sobre a variação na especificidade de iniciadores, Morales e Holben (2009) sugerem que, para a quantificação de microrganismos por qPCR, é necessário que sejam desenhados novos conjuntos de iniciadores específicos.

A utilização de iniciadores inespecíficos em uma cultura mista de BAL, ou seja, se os iniciadores presentes nesta cultura amplificarem mais de uma das BAL presentes, são geradas respostas erradas de quantificação comprometendo os resultados. A inespecificidade dos iniciadores é considerada uma problemática, pois dependendo do fragmento de DNA analisado pode ocorrer que a quantidade de moléculas de DNA não alvo presentes seja maior que a quantidade de moléculas de DNA alvos. A partir disto, as moléculas de DNA alvo não são detectadas tão facilmente devido ao fato dos iniciadores estarem sendo amplamente consumidos pelas moléculas não alvos (TORIJA; MATEO; GUILLAMON, 2010).

Dessa forma, pela inespecificidade dos iniciadores obtidos, testes com temperaturas de anelamento distintas foram avaliadas, buscando aumentar a especificidade desejada.

4.2.2.2 Investigação da temperatura de anelamento do par de iniciadores plnEFFw e plnEFrev na amplificação de *L. plantarum*

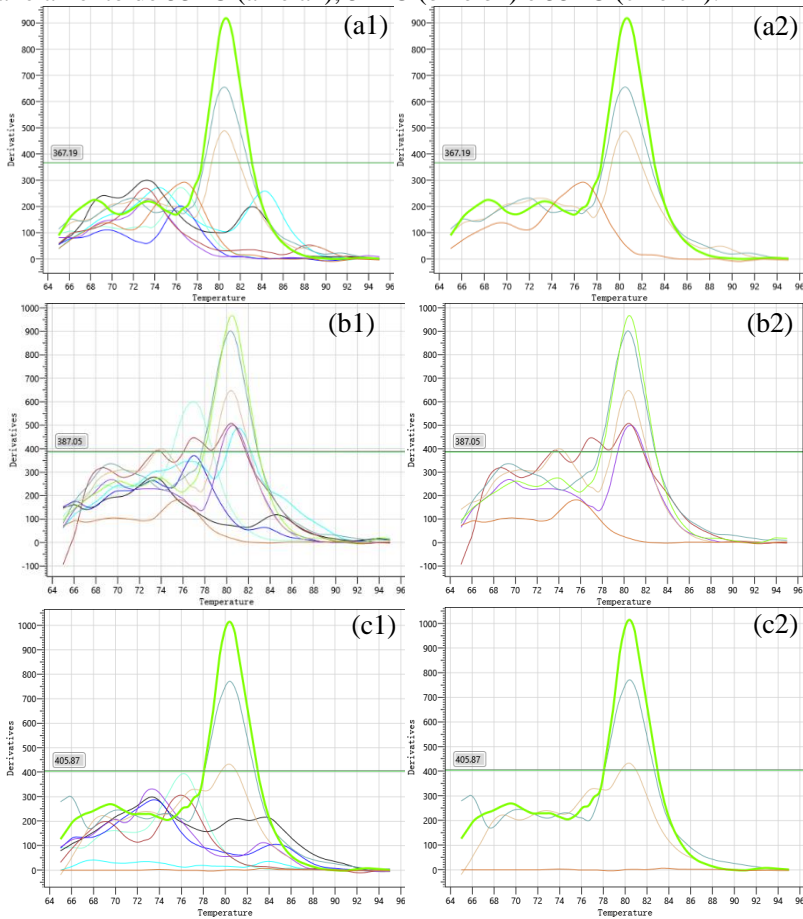
Como os iniciadores selecionados não foram específicos para a amplificação das BAL em estudo, os testes para a quantificação da cultura mista das três BAL não puderam ser realizados. Sendo assim, foram feitos testes para caracterizar individualmente as culturas puras das BAL em estudo.

Apesar de Cho et al. (2011) terem informado a temperatura de anelamento do par de iniciadores utilizado na detecção de *L. plantarum* (plnEFFw e plnEFrev) na fermentação malolática de vinho, através da técnica de PCR quantitativo, foi necessário investigar outras temperaturas para determinar as melhores condições de amplificação da BAL em estudo, visando o aumento da especificidade, da sensibilidade e da eficiência do método.

De acordo com Nascimento (2008), é possível que, a temperatura de anelamento ideal seja diferente da publicada nos trabalhos presentes na literatura, devido ao uso de reagentes diferentes daqueles citados na metodologia destes trabalhos. Os testes foram iniciados com *L. plantarum* devido ao fato desta ser considerada uma das espécies mais comuns encontradas em produtos cárneos (MATAMOROS et al., 2010; FLORES-RONDÓN et al., 2011; LONGHI et al., 2013).

A Figura 23 mostra a amplificação do DNA das diluições de *L. plantarum*, com diferentes temperaturas de anelamento (53, 54 e 55 °C) utilizando o par de iniciadores plnEFFw e plnEFrev. As Figuras 23a1, 23b1 e 23c1 representam as reações de qPCR de todas as diluições testadas (de 10^1 até 10^9 UFC.mL⁻¹) e as Figuras 23a2, 23b2 e 23c2 demonstram somente as amplificações que foram eficientes para as temperaturas de anelamento de 53, 54 e 55 °C, respectivamente e estas reações foram analisadas pelas curvas de *melting*.

Figura 23 - Amplificação do DNA das diluições de *L. plantarum* utilizando o par de iniciadores plnEFfw e plnEFrev nas temperaturas de anelamento de 53 °C (a1 e a2), 54 °C (b1 e b2) e 55 °C (c1 e c2).



Os resultados obtidos na Figura 23 demonstraram que a temperatura de anelamento que ofereceu melhores condições de amplificação, para as diluições de *L. plantarum*, foi de 54 °C. Estas sucessivas diluições testadas representam a curva padrão da bactéria analisada e o limite de detecção definido na curva padrão foi de aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ pois, em concentrações menores, a amplificação não foi específica. Quanto menor for o limite de detecção definido na curva padrão, maior será a sensibilidade e a eficiência do

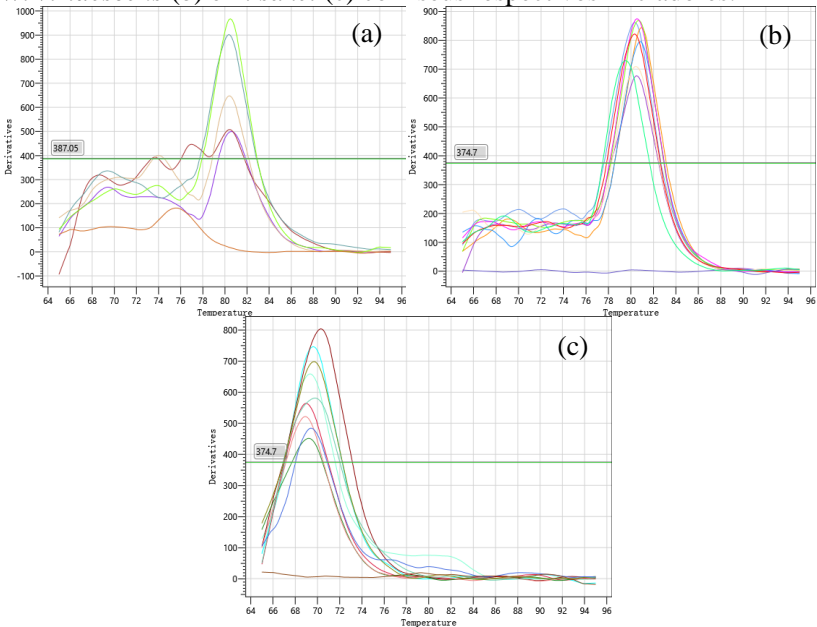
método utilizado. A eficiência das reações de amplificação do DNA extraído pode ser afetada por inúmeros fatores como: erros de pipetagem dos reagentes e amostras utilizados na reação, seleção dos iniciadores, temperaturas de anelamento dos iniciadores, entre outros, sendo necessária a padronização das condições específicas para cada experimento.

O aparecimento de picos diferentes nas curvas de *melting*, demonstrados nas Figuras a1, b1 e c1, pode ser ocasionado por produtos inespecíficos da reação ou a formação de dímeros de iniciadores.

4.2.2.3 Curva padrão das BAL

As Figuras 24a, 24b e 24c mostram as amplificações do DNA das diluições de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente, utilizando seus respectivos pares de iniciadores. As reações foram analisadas pelas curvas de *melting*, sendo somente representadas as amplificações que foram eficientes para cada BAL testada.

Figura 24 - Amplificação do DNA das diluições de *L. plantarum* (a), *W. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) com seus respectivos iniciadores.



A extração do DNA utilizando o método 2 de clorofórmio e álcool isoamílico foi eficiente para *W. viridescens* e *L. sakei*, pois as amplificações originadas na curva padrão de cada uma destas BAL foram satisfatórias e o limite de detecção do método foi de 10^1 UFC.mL⁻¹. Para *L. plantarum* foi observado que nem todas as diluições amplificaram e o limite de detecção definido na curva padrão foi de aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹, como também foi observado no trabalho de Walter et al. (2001). Analisando os resultados obtidos para *L. plantarum*, pode-se perceber que os dois métodos de extração testados não foram eficientes para amplificar todas as concentrações da curva padrão.

De acordo com todos os resultados originados nos experimentos de PCR convencional e qPCR, os iniciadores selecionados da literatura não apresentaram a especificidade necessária para possibilitar a amplificação das BAL presentes na cultura mista, separadamente. No entanto, os pares de iniciadores PRBA63F - Wsla-179-R e SaKF – SaKR amplificaram com eficiência o DNA extraído das culturas puras de *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. Os métodos de extração de DNA testados não foram eficientes para *L. plantarum*, mas o método 2 foi eficiente para *W. viridescens* e *L. sakei*.

Nas pesquisas sobre a aplicação da técnica de qPCR para a quantificação de *Lactobacillus* é comum a utilização do sistema de sondas para a detecção dos produtos de qPCR (MARTÍN et al., 2006; HAAKENSEN, et al., 2007; MARTÍN et al., 2008; TORIJA; MATEO; GUILLAMON, 2010). No presente trabalho, foi utilizado o sistema SYBR Green, sendo que a diferença entre estes dois sistemas é que o sistema SYBR Green detecta todas as fitas duplas de DNA, inclusive produtos de reação não específicos, correndo o risco de gerar sinais falso-positivos, enquanto que o sistema de sondas permitirá somente a detecção dos produtos de amplificação específicos. Com isso, surge a necessidade de otimizar a reação a fim de gerar resultados precisos.

4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os iniciadores selecionados da literatura não apresentaram a especificidade necessária que possibilite a amplificação das BAL presentes na cultura mista, separadamente.

Os pares de iniciadores PRBA63F - Wsla-179-R e SaKF – SaKR amplificaram com eficiência o DNA extraído das culturas puras de *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente.

Os métodos de extração de DNA testados não foram eficientes para

L. plantarum, mas o método 2 foi eficiente para *W. viridescens* e *L. sakei*.

4.4 REFERÊNCIAS

ARRUDA JÚNIOR, R. G. **Temperatura de melting: um estudo comparativo**. 2010. 55 p. Trabalho de conclusão de bacharelado em ciência da computação. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2010.

BYUN, R.; NADKARNI, M. A.; CHHOUR, K. L.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER, N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3128-3136, 2004.

CAMPANA, F. B. **Monitoramento temporal e especial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes**. 2012. 170 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2012.

CHO, G.-S.; KRAUB, S.; HUCH, M.; DU TOIT, M.; FRANZ, M. A. P. C. Development of a Quantitative PCR for Detection of *Lactobacillus plantarum* Starters During Wine Malolactic Fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1280-1286, 2011.

FLORES-RONDÓN, C.; LEAL, M.; RUIZ-RAMÍREZ, J.; SÁNCHEZ, E.; MORENO, M.; CASTRO, G.; BARBOZA, Y. Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. XXI, n. 5, p. 425-433, 2011.

HAAKENSEN, M. C.; BUTT, L.; CHABAN, B.; DENEER, H.; ZIOLA, B. horA-specific real-time PCR for detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 65, p. 157-165, 2007.

HAGEN, R. M.; GAUTHIER, Y. P.; SPRAGUE, L. D.; VIDAL, D. R.; ZYSK, G.; FINKE, E. J.; NEUBAUER, H. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. **Journal of Clinical Pathology Molecular Pathology**, v. 55, n. 6, p. 398-400, 2002.

HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 114-123, 2002.

KWON, H. S.; YANG, E. H.; YEON, S. W.; KANG, B. H.; KIM, T. Y. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 267-275, 2004.

LAMBAIS, M. R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J. C.; BÜLL, R. C.; RODRIGUES, R. R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, v. 312, p. 1917, 2006.

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. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 88-96, 2013.

MARTÍN, B.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; PLA, M.; AYMERICH, T. Rapid Quantitative Detection of *Lactobacillus sakei* in Meat and Fermented Sausages by Real-Time PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6040-6048, 2006.

MARTÍN, M. C.; DEL RIO, B.; MARTÍNEZ, N.; MAGADÁN, A. H.; ALVAREZ, M. A. Fast real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages in milk. **Food Microbiology**, v. 25, p. 978-982, 2008.

MATAMOROS, S.; ANDRÉ, S.; HUE, I.; PRÉVOST, H.; PILET, M. F. Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized “foie gras” products. **Meat Science**, v. 85, p. 467-471, 2010.

MORALES, S. E.; HOLBEN, W. E. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR primer pairs reveals variance in target specificity and efficacy not suggested by in silico analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2677-2683, 2009.

NASCIMENTO, F. M. S. **Aplicação da técnica PCR para detecção de bactérias potencialmente patogênicas em um sistema UASB-lagoas de polimento para tratamento de esgoto doméstico**. 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2008.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

QUEVEDO, B.; GIERTSEN, E.; ZIJNGE, V.; LUTHI-SCHALLER, H.; GUGGENHEIM, B.; THURNHEER, T.; GMUR, R. Phylogenetic group- and species-specific oligonucleotide probes for single-cell detection of lactic acid bacteria in oral biofilms. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 14, 2011.

RANDAZZO, C. L.; TORRIANI, S.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M.; VAUGHAN, E. E. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1882-1892, 2002.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, p. 154-160, 1997.

TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GUILLAMON, J. M. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. **Food Microbiology**, v. 27, p. 257-265, 2010.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, K.; HAMMES, W. P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2578-2585, 2001.

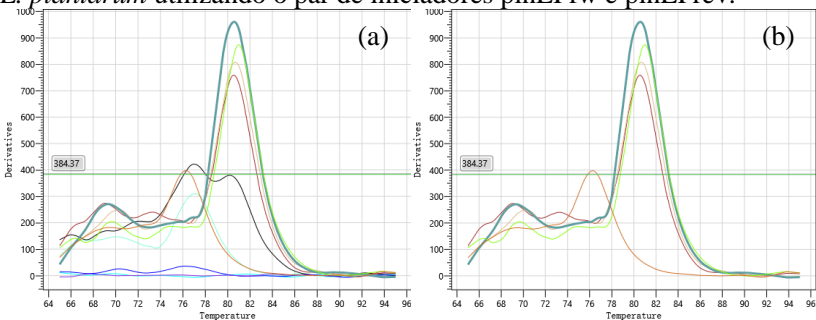
4.5 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Nas reações descritas anteriormente, o inóculo de *L. plantarum* (10^9 UFC.mL⁻¹) foi diluído sucessivamente até a concentração de 10^1 UFC.mL⁻¹ e o DNA de cada uma das diluições foi extraído pelo método 2 para a construção da curva padrão. Análises posteriores de qPCR foram realizadas utilizando diluições seriadas feitas do DNA (10^1 até 10^9 UFC.mL⁻¹) já extraído da concentração de 10^9 UFC.mL⁻¹ (inóculo) de *L. plantarum*, a fim de investigar as melhores condições de amplificação desta BAL, como mostra a Figura 25.

As reações de qPCR para *L. plantarum* foram otimizadas no equipamento *Line Gene 9640*, utilizando uma mistura que totalizava 10 µL, contendo 5 µL de *SYBR MASTER MIX*, 4 µL de DNA, 0,2 µL de iniciador plnEFfw, 0,2 µL de iniciador plnEFrev, 0,2 µL de *ROX* e 0,4 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. A amplificação testada teve a seguinte programação: 95 °C por 3 minutos, após 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e temperatura de anelamento de 54 °C por 20 segundos com aquisição de fluorescência. Ao final a curva de *melting*, foi incluída a seguinte programação: 65 °C por 20 segundos e 95 °C por 20 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

A Figura 25a representa as reações de qPCR de todas as diluições do DNA testadas e a Figura 25b demonstra somente as amplificações que foram eficientes na reação de qPCR.

Figura 25 - Amplificação das diluições do DNA do inóculo de *L. plantarum* utilizando o par de iniciadores plnEFfw e plnEFrev.



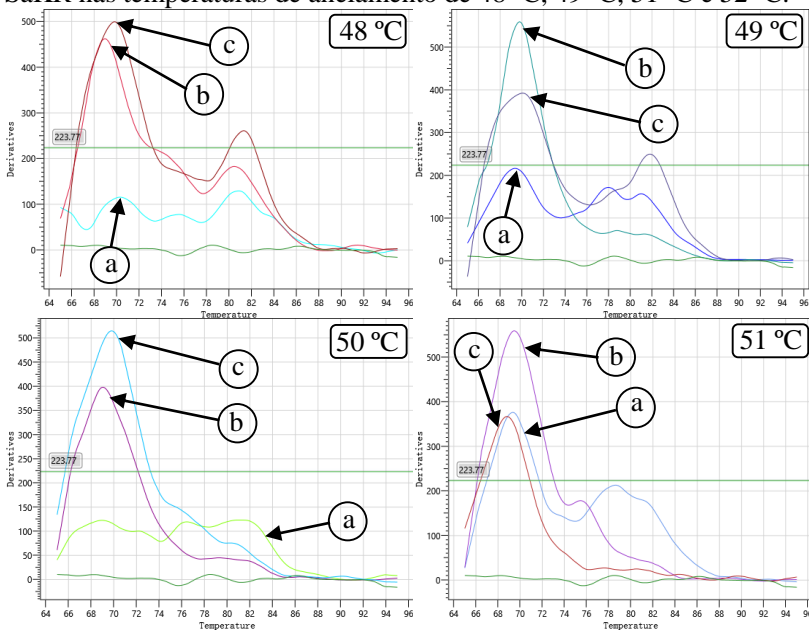
De acordo com a Figura 25, observa-se que tanto extraído o DNA das diferentes diluições, quanto diluindo o DNA extraído da concentração 10^9 UFC.mL⁻¹, não houve melhora nos resultados, pois as amplificações foram eficientes a partir da diluição 10^6 UFC.mL⁻¹.

Também foram realizados testes para investigar a melhor temperatura de anelamento do par de iniciadores SaKF e SaKR, a fim de aumentar a especificidade destes com relação à bactéria *L. sakei*. As temperaturas de anelamento utilizadas foram: 48 °C, 49 °C, 51 °C e 52 °C.

As reações da qPCR foram realizadas no equipamento *Line Gene 9640*, utilizando uma mistura que totalizava 10 μL , contendo 5 μL de *SYBR MASTER MIX*, 4 μL de DNA, 0,2 μL de iniciador SaKF, 0,2 μL de iniciador SaKR, 0,2 μL de *ROX* e 0,4 μL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. Os testes foram feitos com o DNA extraído de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, conforme mostra a Figura 26.

A amplificação testada teve a seguinte programação: 95 °C por 3 minutos, após 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e temperatura de anelamento de 48, 49, 51 ou 52 °C por 20 segundos com aquisição da fluorescência para *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*, respectivamente. Ao final a curva de *melting*, foi incluída a seguinte programação: 65 °C por 20 segundos e 95 °C por 20 segundos com leitura de dados a cada 0,5 °C.

Figura 26 - Amplificação do DNA dos inóculos de *L. plantarum* (a), *W. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) utilizando o par de iniciadores SaKF e SaKR nas temperaturas de anelamento de 48 °C, 49 °C, 51 °C e 52 °C.



De acordo com a Figura 26, observou-se que as ampliações de *L. plantarum* (a) nas temperaturas de anelamento de 48, 49 e 51 °C não foram eficientes, e na temperatura de 52 °C, sua amplificação foi similar ao de *L. sakei* (c). Isto ocorre porque esta temperatura de anelamento é muito próxima à temperatura de anelamento ideal (54 °C) para *L. plantarum*, investigada anteriormente na seção 4.3.3.2. No entanto, *W. viridescens* (b) e *L. sakei* (c) apresentaram ampliações eficientes em todas as temperaturas de anelamento testadas. Com isso não foi possível encontrar uma temperatura de anelamento específica para que o par de iniciadores (SaKF e SaKR) amplificasse somente a bactéria *L. sakei*.

CAPÍTULO 5

5 MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus plantarum* E DA CULTURA MISTA DAS TRÊS BAL EM MEIO DE CULTIVO SOB CONDIÇÕES NÃO ISOTÉRMICAS.

Após a realização dos estudos de cultivo isotérmico das culturas puras de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* e culturas mistas, foram realizados cultivos não isotérmicos de *L. plantarum* e da cultura mista destas três BAL (CM 1), a fim de estudar o comportamento das BAL numa variação de temperatura. A bactéria *L. plantarum* é considerada uma das espécies mais comuns encontradas em produtos cárneos (MATAMOROS et al., 2010; FLORES-RONDÓN et al., 2011; LONGHI et al., 2013). Por isso, foi utilizada isoladamente no estudo da modelagem matemática do crescimento microbiano, sob condições não isotérmicas.

O conhecimento e o controle da microbiota presente na matéria-prima durante o processamento cárneo são essenciais para a garantia da qualidade microbiológica e características sensoriais do produto final. Durante o período de estocagem e distribuição dos alimentos, a temperatura em que estes alimentos estão submetidos, pode sofrer grandes variações. É, portanto, necessário o desenvolvimento de modelos não isotérmicos que possam descrever a influência das flutuações e abusos de temperatura ao longo do tempo, sobre o crescimento microbiano. Estes modelos são muito válidos para a previsão da vida útil dos alimentos, à medida que eles podem simular como os microrganismos se comportam numa variação de temperaturas (KOUTSOUMANIS et al., 2006; CAYRÉ; VIGNOLO; GARRO, 2007).

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Centro Tecnológico (CTC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Bactérias ácido lácticas

As cepas das BAL utilizadas foram descritas no item 1.1.1 do Capítulo 1.

5.1.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo dos experimentos não isotérmicos com *L. plantarum* e cultura mista foi realizado conforme descrito no item 1.1.2 do Capítulo 1.

5.1.3 Condições de crescimento não isotérmico

Em estudos anteriores (Capítulo 2), foi avaliada a influência de diferentes temperaturas sobre os parâmetros de crescimento de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* obtidos pelo modelo primário de BAR (BARANYI e ROBERTS, 1994). A partir dessas informações, foram estabelecidos os modelos secundários, que descreveram a influência da temperatura sobre os parâmetros determinados com o ajuste do modelo primário. Com estes modelos e, considerando o perfil de variação de temperatura desejado, foram estabelecidos modelos não isotérmicos que foram usados para prever o crescimento das BAL, em cada perfil estudado. Posteriormente, foram realizados experimentos em condições não isotérmicas para validar os modelos matemáticos estabelecidos.

Os experimentos em condições não isotérmicas foram realizados em frascos de 500 mL, com volume útil de 320 mL de caldo MRS e 1 % (v/v) de inóculo para *L. plantarum* e com 1 % (v/v) de inóculo associados na proporção 1:1:1 de cada BAL, para a cultura mista. A concentração inicial dos experimentos foi de aproximadamente 10^3 UFC.mL⁻¹ e o pH inicial do meio de cultivo se manteve em torno de 6,0. Os frascos foram incubados em estufa (Dist, Florianópolis, Brasil) em um perfil de temperatura com variação crescente entre 12-20 °C e um perfil de temperatura com variação decrescente entre 20-12 °C para *L. plantarum*, e um perfil de temperatura com variação decrescente entre 30-20 °C para a cultura mista até que as curvas de crescimento atingissem a fase estacionária. A temperatura de dentro das estufas de incubação foi registrada por um *datalogger* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha), a cada 5 minutos.

5.1.4 Construção das curvas de crescimento

Para a construção das curvas de crescimento, utilizou-se o método clássico de contagem de células viáveis para determinar o crescimento de *L. plantarum* e da cultura mista ao longo do tempo, até que as mesmas atingissem a fase estacionária. O plaqueamento foi realizado conforme

descrito no item 1.1.2 do Capítulo 1. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.1.5 Predição do crescimento de *L. plantarum* e da cultura mista em condições não isotérmicas

Para a predição do crescimento de *L. plantarum* e da cultura mista em condições não isotérmicas, foram utilizados o modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (BARANYI e ROBERTS, 1994) e o modelo não isotérmico de Gompertz (VAN IMPE et al., 1992). As Equações utilizadas nesta predição estão descritas no item 2.5 da Revisão da Literatura.

5.1.6 Otimização numérica do modelo não isotérmico

As rotinas computacionais foram desenvolvidas para cada perfil de temperatura estudado. As equações dos modelos não isotérmicos (Baranyi e Roberts e Gompertz) foram resolvidas no *software* MATLAB® R2010a versão 7.10 (MathWorks Natick, EUA). Foi utilizado o método de otimização dos mínimos quadrados não linear e o algoritmo *Trust-Region-Reflective*, que é baseado no conceito de região confiável (*trust region*). As tentativas iniciais, para os valores de cada parâmetro, foram escolhidas de acordo com a análise das curvas experimentais. As equações diferenciais foram resolvidas através da função *ode23* disponível no MATLAB, sendo esta função baseada no método Runge-Kutta e as condições iniciais utilizadas foram adequadas para cada modelo.

5.1.7 Validação do modelo não isotérmico

A avaliação da capacidade preditiva do modelo de crescimento não isotérmico foi realizada através da aplicação dos índices estatísticos: coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro médio quadrático (RMSE), fator bias e fator de exatidão (ROSS, 1996) como descrito no item 2.6 da Revisão da Literatura. Para facilitar a comparação entre os modelos os dados foram expressos como logaritmo natural.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Crescimento não isotérmico de *L. plantarum*

A temperatura é um dos fatores mais associados com o crescimento microbiano e com a deterioração dos produtos cárneos (KOUTSOUMANIS et al., 2006; JUNEJA et al., 2009). As oscilações ocorridas na temperatura de incubação das carnes e produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada durante o armazenamento colaboram com o desenvolvimento e multiplicação de bactérias deteriorantes, como é o caso das BAL avaliadas nesta tese, afetando a duração da vida útil destes alimentos. Portanto, o estudo do comportamento das BAL quando ocorrem as flutuações e abusos de temperatura durante o armazenamento é importante para fundamentar a estimativa da vida útil destes alimentos.

A predição do crescimento não isotérmico de *L. plantarum*, utilizando os modelos de BAR e GO, foi estabelecida a partir das curvas de crescimento desta bactéria sob condições isotérmicas (faixa de temperatura entre 4 e 30 °C), obtidas previamente. A influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento da BAL foi descrita através dos modelos secundários, conforme apresentado no item 2.2.2 do Capítulo 2.

O modelo não isotérmico de GO foi utilizado em conjunto com os modelos secundários da raiz quadrada e do tipo Arrhenius que descreveram a influência da variação da temperatura nos parâmetros $\mu_{\text{máx}}$ e A, respectivamente, pois neste modelo é considerado o parâmetro A ao invés do $N_{\text{máx}}$, como ocorre no modelo de BAR. O modelo não isotérmico de BAR foi utilizado em conjunto com o modelo secundário da raiz quadrada, que descreveu a influência da variação da temperatura no parâmetro $\mu_{\text{máx}}$. O valor de $N_{\text{máx}}$ foi considerado a média dos valores obtidos na faixa de temperatura estudada (12 – 20 °C). Para o parâmetro h_0 , foi utilizado um valor médio de 0,74 ($\pm 0,55$) conforme descrito no item 2.2.1 do Capítulo 2. Se apenas a faixa de temperatura utilizada no estudo não isotérmico (12 a 20 °C) for considerada para o cálculo de h_0 , a média será de 0,63 ($\pm 0,06$). Os dois valores de h_0 forneceram previsões praticamente coincidentes, demonstrando que a variação de h_0 de 0,63 para 0,74 não afeta a predição do crescimento, dentro da faixa estudada (Figuras 24 e 25).

O valor determinado para o h_0 irá depender do tipo de microrganismo estudado e do meio de cultivo ou matriz alimentar utilizada. Gospavic et al. (2008) afirmaram que h_0 não é influenciado

pelos parâmetros de crescimento microbiano, sendo considerado um parâmetro constante, ou seja, o valor do parâmetro h_0 deverá ser fixado com um valor médio para todas as temperaturas de incubação avaliadas.

Alguns autores também definiram um valor médio para h_0 . Baranyi et al. (1995) determinaram um valor médio para h_0 de 3,2 quando estudaram o crescimento de *Brochothrix thermosphacta* em meio de cultivo. Amézquita et al. (2005) definiram um valor médio para h_0 de 6,7 para o crescimento de *Clostridium perfringens* em carne cozida. No estudo sobre a influência do efeito da temperatura no crescimento de *Salmonella* em frangos, Juneja et al. (2007) verificaram um valor médio para h_0 de 1,75. Velugoti et al. (2011) determinaram um valor médio de h_0 igual a 2,14 quando desenvolveram um modelo dinâmico preditivo para o crescimento de *Salmonella* em carne de porco moída. Dalcanton (2010) definiu um valor médio de h_0 igual a 0,41 para a modelagem dos efeitos combinados da temperatura, pH, cloreto de sódio e lactato de sódio na velocidade de crescimento de *L. plantarum*.

A partir das predições obtidas, as curvas de crescimento de *L. plantarum* para os dois perfis não isotérmicos (12-20 e 20-12 °C) experimentais foram obtidas e comparadas às preditas dos modelos não isotérmicos de BAR e GO. A Tabela 10 mostra a comparação dos índices estatísticos (RMSE, bias, exatidão e R^2) feita entre os modelos não isotérmicos de BAR e GO para os dois perfis não isotérmicos de *L. plantarum*.

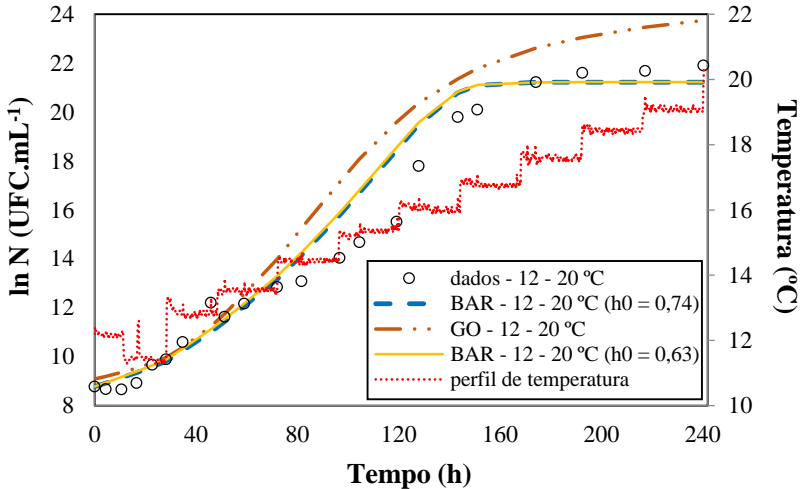
Tabela 10 - Comparação dos índices estatísticos dos modelos não isotérmicos de BAR e GO avaliados para os dois perfis de temperatura (12-20 e 20-12 °C) para *L. plantarum*.

| Índices | Modelos | 12 °C – 20 °C | 20 °C – 12 °C |
|----------|---------|---------------|---------------|
| RMSE | BAR | 1,173 | 0,705 |
| | GO | 1,884 | 0,867 |
| Bias | BAR | 1,031 | 0,999 |
| | GO | 1,072 | 1,029 |
| Exatidão | BAR | 1,052 | 1,027 |
| | GO | 1,085 | 1,035 |
| R^2 | BAR | 0,973 | 0,989 |
| | GO | 0,962 | 0,992 |

De acordo com a análise dos índices estatísticos (RMSE, bias, exatidão e R^2), os dois modelos não isotérmicos avaliados (BAR e GO) apresentaram uma boa capacidade preditiva para os dois perfis de

temperatura (12-20 e 20-12 °C) de *L. plantarum*. No entanto, os valores destes índices foram ligeiramente melhores para o modelo de BAR. Na Figura 27, estão representadas as validações dos modelos não isotérmicos de BAR e GO para o perfil de temperatura (12-20 °C) de *L. plantarum*.

Figura 27 - Validações dos modelos não isotérmicos de BAR e GO para o perfil de temperatura com variação crescente de 12 até 20 °C de *L. plantarum*.



De acordo com a Figura 27, os dois modelos não isotérmicos avaliados (BAR e GO) superestimaram o crescimento não isotérmico de *L. plantarum* com perfil de temperatura crescente de 12 até 20 °C em diversos pontos da curva, mas o modelo de BAR apresentou melhor capacidade preditiva do que o modelo de GO, confirmando a comparação dos índices estatísticos apresentados na Tabela 10. O controle da temperatura nas estufas de incubação foi realizado manualmente, por isso houve uma variação não programada nas primeiras horas do experimento.

Nos estudos de Decker et al. (2013), o modelo de BAR superestimou o crescimento microbiano de *Clostridium perfringens* em carne moída cozida, ao contrário do novo modelo matemático estudado, denominado modelo TRG (TELEKEN; ROBAZZA; GOMES, 2011), que subestimou o crescimento do mesmo microrganismo. Longhi et al. (2013) observaram que todas as previsões não isotérmicas feitas pelos modelos Logístico modificado, Gompertz modificado, Baranyi e Roberts, Fujikawa, Kai e Morozumi e Huang apresentaram dados superestimados,

não sendo possível identificar qual o modelo apresentou melhor predição em condições não isotérmicas para *L. plantarum*. No entanto, quando se trata de segurança dos alimentos, a superestimação do crescimento microbiano é melhor do que a subestimação, pois se trabalha com uma margem de segurança (DECKER et al., 2013).

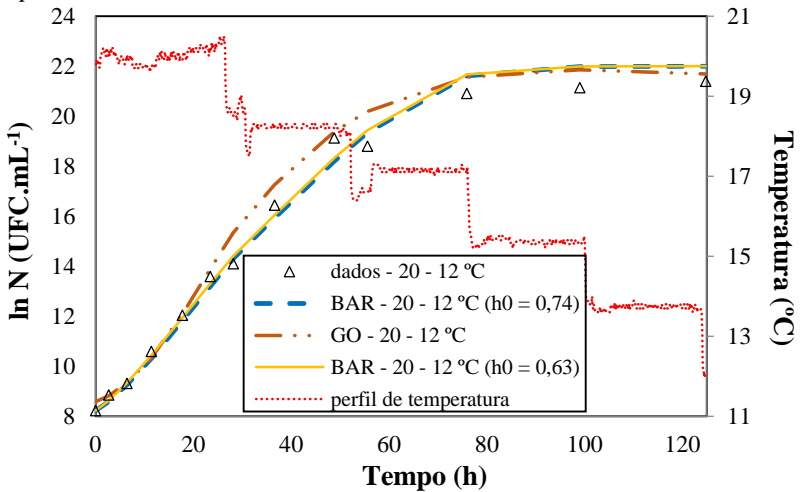
A capacidade de predição dos modelos não isotérmicos está relacionada com a qualidade do ajuste dos modelos primário e secundário de *L. plantarum*, o que explica a superestimação acentuada do modelo de GO em praticamente toda a curva de crescimento (Figura 27). A qualidade do ajuste dos modelos primário e secundário influenciou na predição do crescimento não isotérmico de *L. plantarum* para o perfil de temperatura 12-20 °C. Conforme descrito no Capítulo 2, o ajuste do modelo de BAR apresentou os melhores valores para os índices estatísticos do que o ajuste do modelo de GO às curvas de crescimento isotérmico de *L. plantarum*. E mesmo apresentando um bom ajuste, o modelo de BAR também superestimou os dados experimentais de crescimento não isotérmico desta bactéria.

Na mesma Figura, foi observado um pequeno atraso no crescimento de *L. plantarum* próximo à temperatura de 14 °C, supondo que a bactéria necessita de pequenas adaptações quando o seu crescimento inicia com baixas temperaturas de incubação até atingir temperaturas elevadas (20 °C). Algumas alterações microbianas que podem ocorrer ao longo do crescimento não isotérmico não podem ser preditas, pelos modelos não isotérmicos presentes na literatura, devido a ausência de um parâmetro que descreva estas alterações como comprovado por Zwietering et al. (1994) quando adicionaram o termo λ_{shift} no modelo de Gompertz Modificado para representar uma fase de adaptação intermediária de *L. plantarum* após mudanças na temperatura de incubação.

Com isso, a incorporação dos complexos mecanismos de adaptação microbiana aos modelos de previsão é um desafio a ser superado. Longhi et al. (2013) também registraram a mesma dificuldade de predição do crescimento não isotérmico de *L. plantarum* em dois perfis de temperatura estudados (4-12 °C e 5-15 °C) pelos modelos Logístico Modificado e Baranyi e Roberts.

Na Figura 28, estão representadas as validações dos modelos não isotérmicos de BAR e GO para o perfil de temperatura (20-12 °C) de *L. plantarum*.

Figura 28 - Validações dos modelos não isotérmicos de BAR e GO para o perfil de temperatura com variação decrescente de 20 até 12 °C de *L. plantarum*.



Os resultados apresentados na Tabela 10 também foram confirmados pela análise da Figura 28, pois o modelo de BAR apresentou melhor capacidade preditiva para descrever o crescimento não isotérmico de *L. plantarum* com perfil de temperatura decrescente de 20 até 12 °C, do que o modelo de GO. Quando as duas predições do modelo não isotérmico de BAR apresentadas nas Figuras 27 e 28 são comparadas, nota-se que o modelo apresentou melhor capacidade preditiva para o perfil de temperatura 20-12 °C (Figura 28) do que para o perfil de temperatura 12-20 °C (Figura 27), ou seja, o modelo previu melhor quando o crescimento iniciou com uma temperatura de incubação mais próxima da temperatura ótima de crescimento das BAL (30 °C). Na avaliação de Longhi et al. (2013) sobre a capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento de *L. plantarum*, sob diferentes condições não isotérmicas, também foi observado que quando o perfil de temperatura avaliado se aproxima das condições ótimas de crescimento das BAL (30 °C), a capacidade de predição dos modelos melhora.

Na análise da Figura 28 foi possível observar que após 80 h de experimento, num total de 120 h, a curva de crescimento não isotérmico de *L. plantarum* encontra-se quase no final da parte exponencial, e a temperatura de incubação ainda está elevada (em torno de 18,5 °C). Neste

caso, não adiantará diminuir a temperatura de incubação, pois o microrganismo já atingiu a sua concentração máxima. Caso contrário, se a curva de crescimento começa com uma temperatura de incubação mais baixa (Figura 27) a curva de crescimento não isotérmico de *L. plantarum* encontra-se no começo da fase estacionária em aproximadamente 180 h de experimento, ou seja, 100 h depois do que foi analisado na Figura 28.

Os abusos de temperatura que podem ocorrer durante o armazenamento de produtos cárneos, como é o caso das temperaturas utilizadas na avaliação do crescimento não isotérmico de *L. plantarum*, colaboram com o crescimento das BAL e, com a diminuição da vida útil destes alimentos. Isto pode afetar a qualidade e a segurança dos produtos cárneos e com isso, colocar em risco a saúde do consumidor.

Segundo Dalcanton (2010), o comportamento global das BAL em meio de cultivo representa adequadamente as condições de deterioração ocasionadas por estas bactérias nos produtos cárneos. Portanto, o estudo dos abusos de temperatura através dos resultados obtidos do comportamento das BAL em meio de cultivo, podem colaborar com a predição do crescimento destas bactérias nos produtos cárneos, simulando adequadamente as condições reais que ocorrem nestes alimentos.

5.2.2 Crescimento não isotérmico da cultura mista

A literatura é bem escassa quando se trata do crescimento não isotérmico de culturas mistas das BAL. De acordo com a necessidade de simular as variações de temperatura na cadeia de frio que acontecem nos produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada, foi testado o crescimento não isotérmico da cultura mista de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*. O crescimento isotérmico de culturas mistas foi estudado apenas às temperaturas de 20 e 30 °C (Capítulo 3). Para obtenção do modelo secundário, necessário para prever o crescimento não isotérmico, são necessárias, pelo menos, quatro temperaturas isotérmicas. Assim, para a predição do crescimento não isotérmico da cultura mista, optou-se por considerar o modelo não isotérmico obtido para cada bactéria isoladamente e depois comparar a capacidade preditiva destes modelos com os dados experimentais obtidos.

A predição do crescimento não isotérmico das BAL (*L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei*) no perfil de temperatura decrescente de 30 até 20 °C, baseou-se no estudo do crescimento isotérmico de cada BAL descrito no Capítulo 2. Este mesmo procedimento foi realizado, a fim de verificar qual destas bactérias apresenta uma predição mais compatível

com a descrição do crescimento não isotérmico da cultura mista.

A Tabela 11 mostra a comparação dos índices estatísticos (RMSE, bias, exatidão e R^2) feita entre os dois modelos não isotérmicos avaliados (BAR e GO) para o perfil não isotérmico (30-20 °C) da cultura mista utilizando os ajustes primários e secundários de *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. sakei* separadamente.

Tabela 11 - Comparação dos índices estatísticos dos modelos não isotérmicos de BAR e GO avaliados para o perfil não isotérmico (30-20 °C) da cultura mista.

| Índices | Modelos | 30 °C – 20 °C ^a | 30 °C – 20 °C ^b | 30 °C – 20 °C ^c |
|----------------|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| RMSE | BAR | 1,245 | 1,028 | 1,018 |
| | GO | 0,953 | 1,613 | 1,015 |
| Bias | BAR | 0,961 | 1,036 | 1,035 |
| | GO | 1,021 | 1,067 | 1,006 |
| Exatidão | BAR | 1,045 | 1,039 | 1,039 |
| | GO | 1,040 | 1,068 | 1,040 |
| R ² | BAR | 0,977 | 0,984 | 0,984 |
| | GO | 0,984 | 0,968 | 0,979 |

^a modelo não isotérmico utilizando os ajustes dos modelos primário e secundário de *L. plantarum*

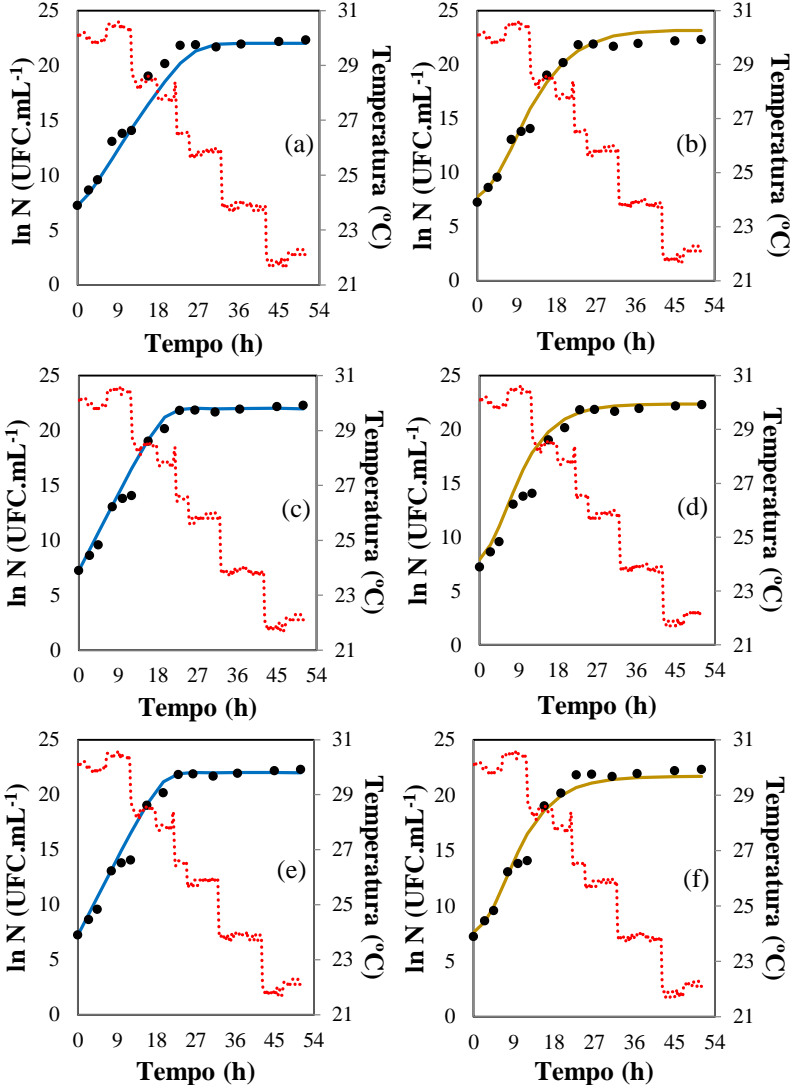
^b modelo não isotérmico utilizando os ajustes dos modelos primário e secundário de *L. viridescens*

^c modelo não isotérmico utilizando os ajustes dos modelos primário e secundário de *L. sakei*

De acordo com a análise dos índices estatísticos (RMSE, bias, exatidão e R^2), os dois modelos não isotérmicos avaliados (BAR e GO) apresentaram uma boa capacidade preditiva para o perfil de temperatura (30-20 °C) da cultura mista para os três modelos de predição utilizados. No entanto, os valores destes índices foram ligeiramente melhores para o modelo de BAR quando utilizou-se os modelos primário e secundário de *W. viridescens* e de *L. sakei*, demonstrando uma boa predição com o uso dos ajustes de uma das BAL presentes na cultura mista.

A Figura 29 mostra as validações dos modelos não isotérmicos de BAR e GO para o perfil de temperatura decrescente de 30 até 20 °C para as três BAL.

Figura 29 - Validações dos modelos não isotérmicos de BAR (—) e GO (—) para o perfil de temperatura (30-20 °C) da cultura mista utilizando os ajustes dos modelos primários e secundários de *L. plantarum* (a,b), *W. viridescens* (c,d) e *L. sakei* (e,f). A linha pontilhada (.....) representa o perfil de temperatura e os símbolos (●) representam os dados experimentais não isotérmicos.



O modelo de BAR teve boa capacidade preditiva para o crescimento não isotérmico da cultura mista com perfil de temperatura decrescente de 30 até 20 °C quando utilizou o ajuste dos modelos primário e secundário de *W. viridescens* e de *L. sakei* (Figuras 29c e 29e). Sendo que as validações deste modelo não isotérmico a partir dos dados experimentais isotérmicos de *L. plantarum* (Figura 29a) não foram tão boas quando comparadas com as demais BAL em estudo, pois o modelo falhou de forma perigosa, ou seja, o ajuste do modelo de BAR, neste caso, ficou abaixo dos valores observados. A partir disto, existe a possibilidade destas duas espécies (*W. viridescens* e *L. sakei*) estarem predominando na cultura mista e com isso, apresentaram o melhor ajuste para o crescimento não isotérmico da cultura mista.

Esta hipótese só poderá ser confirmada com o uso de técnicas moleculares, como a qPCR, possibilitando a investigação das verdadeiras interações ocorridas tanto no crescimento não isotérmico quanto no crescimento isotérmico de uma cultura mista de BAL.

Os resultados descritos anteriormente, nos Capítulos 2, 3 e 4, também demonstram que a bactéria *L. plantarum* apresenta algumas características diferentes das demais BAL avaliadas nesta tese. De acordo com os resultados apresentados ao longo deste estudo, o modelo de BAR foi escolhido para definir os parâmetros de crescimento isotérmico das BAL nas culturas puras e mista pois, destacou-se ligeiramente com relação ao seu desempenho para descrever os dados experimentais. Isto também foi observado na predição e validação das curvas de crescimento não isotérmico de *L. plantarum* e cultura mista das três BAL.

5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

O modelo não isotérmico de BAR apresentou melhor capacidade preditiva para os diferentes perfis de temperatura estudados para *L. plantarum* e CM 1 quando utilizou o ajuste dos modelos primário e secundário de *W. viridescens* e de *L. sakei*, no entanto apresentou um ajuste que falhou de forma perigosa quando utilizou os modelos primário e secundário de *L. plantarum*.

A qualidade do ajuste dos modelos secundários influenciou na predição do crescimento de *L. plantarum* e da cultura mista das BAL em condições não isotérmicas.

Os abusos ou flutuações de temperatura que podem acontecer no cotidiano irão influenciar diretamente no crescimento das BAL.

5.4 REFERÊNCIAS

AMÉZQUITA, A.; WELLER, C. L.; WANG, L.; THIPPAREDDI, H.; BURSON, D. E. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 123-144, 2005.

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

BARANYI, J.; ROBINSON, T. P.; KALOTI, A.; MACKEY, B. M. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 61-75, 1995.

CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G. M.; GARRO, O. A. Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. **Información Tecnológica**, v.18, p.23-29, 2007.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. 2010. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2010.

DECKER, M.; GOMES, G. A.; GALVÃO, A. C.; ROBAZZA, W. S. Evaluation of a new mathematical model to describe *Clostridium perfringens* growth during the cooling of cooked ground beef. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 507-512, 2013.

FLORES-RONDÓN, C.; LEAL, M.; RUIZ-RAMÍREZ, J.; SÁNCHEZ, E.; MORENO, M.; CASTRO, G.; BARBOZA, Y. Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. XXI, n. 5, p. 425-433, 2011.

GOSPAVIC, R.; KREYENSHIMIDT, J.; BRUCKNER, S.; POPOV, V.; HAQUE, N. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 290-297, 2008.

JUNEJA, V.; MELENDRES, M.; HUANG, L.; GUMUDAVELLI, V.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. **Food Microbiology**, v. 24, p. 328-335, 2007.

JUNEJA, V. K.; MELENDRES, M. V.; HUANG, L.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H. Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45°C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 106-111, 2009.

KOUTSOUMANIS, K.; STAMATIOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G-J. E. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 124-134, 2006.

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. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 88-96, 2013.

MATAMOROS, S.; ANDRÉ, S.; HUE, I.; PRÉVOST, H.; PILET, M. F. Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized “foie gras” products. **Meat Science**, v. 85, p. 467-471, 2010.

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

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

VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M.; MARTENS, T.; DE BAERDEMAEKER, J.; VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 58, n. 9, p. 2901-2909, 1992.

VELUGOTI, P.R.; BOHRA, L.K.; JUNEJA, V.K.; HUANG, L.; WESSELING, A.L.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. ***Food Microbiology***, v. 28, p. 796-803, 2011.

ZWIETERING, M. H.; WIT, J. C. de; CUPPERS, H. G. A. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 60, n. 1, p.204-213, 1994.

PARTE 4 – CONCLUSÃO FINAL

De acordo com os resultados apresentados nesta tese foi possível chegar às seguintes conclusões:

Foi definido um modelo de correlação para a construção das curvas de crescimento das BAL, a partir da associação dos métodos de plaqueamento e medidas de absorbância.

O modelo de BAR foi escolhido para determinação dos parâmetros de crescimento isotérmico das BAL nas diferentes temperaturas de incubação testadas.

Não foi observado crescimento de *L. plantarum* na temperatura de incubação de 4 °C.

As curvas de crescimento de *W. viridescens* e *L. sakei* não apresentaram fase lag.

O crescimento das BAL é fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento.

Os modelos secundários obtidos permitem prever o crescimento das BAL, dentro da faixa de temperatura testada (de 4 °C a 30 °C).

O modelo de BAR foi escolhido para determinação dos parâmetros de crescimento isotérmico das culturas mistas 1 e 2 nas diferentes temperaturas de incubação testadas.

A retirada de *L. plantarum* da cultura mista 1 influenciou a duração da fase lag e a velocidade específica máxima de crescimento.

Com relação a técnica de qPCR, os pares de iniciadores selecionados não são específicos para amplificar as BAL presentes na cultura mista separadamente.

Não foi possível estabelecer uma metodologia para contagem de BAL em cultura mista.

O modelo não isotérmico de BAR apresentou melhor capacidade preditiva para os diferentes perfis de temperatura estudados para *L. plantarum*.

Para a CM 1, o modelo não isotérmico de BAR apresentou a melhor capacidade preditiva, quando utilizou o ajuste dos modelos primário e secundário de *W. viridescens* e de *L. sakei*, no entanto apresentou um ajuste que falhou de forma perigosa quando utilizou os modelos primário e secundário de *L. plantarum*.

A qualidade do ajuste dos modelos secundários influenciou na predição do crescimento de *L. plantarum* e da cultura mista 1 das BAL em condições não isotérmicas.

Os resultados apresentados nesta tese são de grande interesse para as indústrias processadoras de carnes e produtos cárneos, pois são úteis para estimar o comportamento de bactérias deteriorantes quando presentes em alimentos. Estudos relacionados com a deterioração dos alimentos, causada pelo crescimento de microrganismos indesejáveis, é sempre de grande interesse para diversos tipos de indústrias.

A modelagem matemática das curvas de crescimento microbiano, construídas pelo uso da técnica de qPCR, é uma alternativa promissora que além de fornecer os resultados mais rapidamente, possibilita a caracterização e a identificação das cepas utilizadas. Este tipo de estudo aplicado à modelagem do crescimento de culturas mistas, torna o método mais vantajoso quando comparado às técnicas convencionais normalmente utilizadas.

O estudo da modelagem do crescimento das BAL em meio de cultivo apresenta fatores que podem ser controlados mais facilmente do que em matrizes alimentares. Com isso, é possível estudar, com mais detalhamento, a influência de diversos fatores no crescimento das BAL.

PARTE 5 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar os resultados obtidos com os modelos primários e secundários, gerados pela modelagem das BAL em meio de cultivo, para prever o crescimento sob condições não-isotérmicas destas bactérias nos produtos cárneos;
- Investigar um método de extração do DNA de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei*, que forneça um DNA de qualidade para as reações de amplificação das BAL;
- Desenhar iniciadores específicos para amplificar a região que se deseja estudar de *L. plantarum*, *L. viridescens* e *L. sakei* presentes na cultura mista, possibilitando identificar, individualmente, a cinética de crescimento de cada uma destas bactérias;
- Investigar outras técnicas moleculares para a quantificação das BAL presentes na cultura mista;
- Obter de um método que relacione os resultados obtidos pela técnica de quantificação molecular com o número de células de bactérias totais, a fim de estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) por unidade de massa ou volume de amostra das três BAL;
- Estudar as interações ocorridas entre as BAL presentes na cultura mista através de técnicas moleculares, e avaliar a relação existente com a duração da vida útil dos alimentos cárneos.

PARTE 6 - REFERÊNCIAS

A Biologia e os Desafios da Actualidade. Disponível em: <http://biologia.ap.no.comunidades.net/index.php?pagina=1288163696>. Acesso em: 14 mai. 2014.

ADAMBERG, K.; KASK, S.; LAHT, T-M.; PAALME, T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 171-183, 2003.

ALTIERI, C.; BEVILACQUA, A.; D'AMATO, D.; DEL NOBILE, M.A.; SINIGAGLIA, M. Modelling the survival of starter lactic acid bacteria and *Bifidobacterium bifidum* in single and simultaneous cultures. **Food Microbiology**, v. 25, p. 729-734, 2008.

AMÉZQUITA, A.; WELLER, C. L.; WANG, L.; THIPPAREDDI, H.; BURSON, D. E. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 123-144, 2005.

ANTWI, M.; THEYS, T. E.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J. F.; GEERAERD, A. H. Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel system: Effect of monopotassium phosphate. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p. 320-329, 2008.

ANTWI, M.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J. F.; GEERARERD, A. H. Modelling the combined effect of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 71-84, 2007.

ARRUDA JÚNIOR, R. G. **Temperatura de melting: um estudo comparativo**. 2010. 55 p. Trabalho de conclusão de bacharelado em ciência da computação. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2010.

AUGUSTIN, J. C.; BROUILLAUD-DELATTRE, A.; ROSSO, L.; CARLIER, V. Significance of Inoculum Size in the Lag Time of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1706-1710, 2000.

AUGUSTIN, J. C.; ROSSO, L.; CARLIER, V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 576, p. 169-181, 2000.

AUGUSTIN, J. C.; CARLIER, V. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 29-51, 2000.

AUGUSTIN, J. C.; ROSSO, L.; CARLIER, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 38, p. 137-146, 1999.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. ed. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2004.

BARANYI, J. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. **Journal of Theoretical Biology**, v. 192, p. 403-408, 1998.

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

BARANYI, J.; PIN, C. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 732-736, 1999.

BARANYI, J.; ROBINSON, T. P.; KALOTI, A.; MACKEY, B. M. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 61-75, 1995.

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 261-277, 2004.

BATY, F.; FLANDROIS, J.P.; DELIGNETTE-MULLER, M.L. Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5816-5825, 2002.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D.; LABADIE, J. C.; LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiology Methods**, v. 25, p. 225-232, 1996.

BIESTA-PETERS, E. G.; MOLS, M.; REIJ, M. W.; ABEE, T. Physiological parameters of *Bacillus cereus* marking the end of acid-induced lag phases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 42-47, 2011.

BIESTA-PETERS, E. G.; REIJ, M. W.; JOOSTEN, H.; GORRIS, L. G. M.; ZWIETERING, M. H. Comparison of Two Optical-Density-Based Methods and a Plate Count Method for Estimation of Growth Parameters of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1399-1405, n. 5, 2010.

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.

BRASIL. Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. **Portaria CVS-6/99, de 10.03.99**. Aprova o regulamento técnico que estabelece os Parâmetros e Critérios para o Controle Higiênico-Sanitário em Estabelecimento de Alimentos. Brasília, 1999.

BRÉAND, S.; FARDEL, G.; FLANDROIS, J. P.; ROSSO, L.; TOMASSONE, R. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 157-167, 1997.

BRUCKNER, S.; ALBRECHT, A.; PETERSEN, B.; KREYENSCHMIDT, J. A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. **Food Control**, v. 29, p. 451-460, 2013.

BRUL, S.; VAN GERWEN, S.; ZWIETERING, M. **Modelling microorganisms in Food**. Woodhead, Cambridge, UK, 2007.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: A comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v. 14, p. 313-326, 1997.

BUCHANAN, R. L.; PHILIPS, J. G. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 370-376, 1990.

BYUN, R.; NADKARNI, M. A.; CHHOUR, K. L.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER, N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3128-3136, 2004.

CAMPANA, F. B. **Monitoramento temporal e especial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes**. 2012. 170 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 2012.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CAYRÉ, M. E.; GARRO, O.; VIGNOLO, G. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. **Food Microbiology**, v. 22, p. 505-512, 2005.

- CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v. 20, p. 561-566, 2003.
- CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G. M.; GARRO, O. A. Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. **Información Tecnológica**, v.18, p.23-29, 2007.
- CHAILLOU, S.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M.C.; CORNET, M.; CRUTZ-LE COQ, A. M.; DUDEZ, A. M.; MARTIN, V.; BEAUFILS, S.; DARBON-RONGÈRE, E.; BOSSY, R.; LOUX, V.; ZAGOREC, M. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1527-1533, 2005.
- CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Selective detection, enumeration and identification of potential probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 1-27, 1997.
- CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Kinetic modeling of kefiran production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 570-579, 2007.
- CHEIRSILP, B.; SHOJI, H.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for Kefiran Production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 279-284, 2003.
- CHENOLL, E.; MACIAN, M. C.; ELIZAQUIVEL, P.; AZNAR, R. Lactic acid bacteria associated with vacuum packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA based methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 498-508, 2007.

- CHEROUTRE-VIALETTE, M.; LEBERT, I.; HEBRAUD, M.; LABADIE, J. C.; LEBERT, A. Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 71-77, 1998.
- CHO, G.-S.; KRAUB, S.; HUCH, M.; DU TOIT, M.; FRANZ, M. A. P. C. Development of a Quantitative PCR for Detection of *Lactobacillus plantarum* Starters During Wine Malolactic Fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1280-1286, 2011.
- CHORIN, E.; THUAULT, D.; CLÉRET, J.-J.; BOURGEOIS, C.-M. Modelling *Bacillus cereus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 229-234, 1997.
- COEURET, V.; DUBERNET, S.; BERNARDEAU, M.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, J. P. Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. **Lait**, v. 83, p. 269-306, 2003.
- COLLINS, M. D.; RODRIGUES, U.; ASH, C.; AGUIRRE, M.; FARROW, J. A. E.; MARTINEZ-MURCIA, A.; PHILIPS, B. A.; WILLIAMS, A. M.; WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 5-12, 1991.
- COMI, G.; IACUMIN, L. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile off-flavour compounds in artisan cooked ham. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 114-121, 2012.
- CORRADINI, M.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 187-200, 2005.
- COSTA, J. C. C. P. **Efeito do tratamento termoquímico (óleo essencial e calor) no crescimento microbiano durante a vida útil de mexilhões (*perna perna*) processados em embalagens flexíveis**. 2013. 175 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2013.

CUPPERS, H. G. A. M.; SMELT, J. P. P. M. Time to turbidity measurement as a tool for modeling spoilage by *Lactobacillus*. **Journal of Industrial Microbiological**, v. 12, p.168-171, 1993.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. 2010. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2010.

DALCANTON, F.; PEREZ-RODRIGUEZ, 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 Microbiology**, v. 48, p. 2580-2587, 2013.

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 183-196, 2001.

DALGAARD P.; ROSS, T.; KAMPERMAN, L.; NEUMEYER, K.; McMEEKIN, T. A. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 391-404, 1994.

DECKER, M.; GOMES, G. A.; GALVÃO, A. C.; ROBAZZA, W. S. Evaluation of a new mathematical model to describe *Clostridium perfringens* growth during the cooling of cooked ground beef. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 507-512, 2013.

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

DOULGERAKI, A. I.; PARAMITHIOTIS, S.; KAGKLI, D. M.; NYCHAS, G-J. E. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1028-1034, 2010.

DOULGERAKI, A. I.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F.; NYCHAS, G.-J. E. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 130-141, 2012.

DUFFY, G.; SHERIDAN, J. J.; BUCHANAN, R. L.; MCDOWELL, D. A.; BLAIR, I. S. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in selective enrichment broths. **Food Microbiology**, v. 11, p. 429-438, 1994.

DUŠKOVÁ, M.; KAMENÍK, J.; KARPÍŠKOVÁ, R. *Weissella viridescens* in meat products - a review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 82, p. 237-241, 2013.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., TORRIERI, E., MASI, P., VILLANI, F. Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4663-4671, 2006.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., NASI, A., FERRANTI, P., VILLANI, F. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1990-2001, 2009.

ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.; VETTER, E. A.; YAO, J. D. C.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.; COCKERILL III, F. R.; SMITH, T. F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165-256, 2006.

ESTY, J. R.; MEYER, K. F. The heat resistance of the spore of *B. botulinum* and allied anaerobes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p. 650-663, 1922.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592, 1997.

FADDA, S.; OLIVER, G.; VIGNOLO, G. Protein Degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a Sausage Model System. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 3, p. 1179-1183, 2002.

FADDA, S.; CHAMBON, C.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M. C.; TALON, R.; VIGNOLO, G. *Lactobacillus* role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat. **Meat Science**, v. 79, p. 603-610, 2008.

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

FLORES-RONDÓN, C.; LEAL, M.; RUIZ-RAMÍREZ, J.; SÁNCHEZ, E.; MORENO, M.; CASTRO, G.; BARBOZA, Y. Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. XXI, n. 5, p. 425-433, 2011

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN, C. J. Molecular microbial ecology: land of the one eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 210-220, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FRANCOIS, K.; DEVLIEGHIERE, F.; STANDAERT, A. R.; GEERAERD, A. H.; VAN IMPE, J. F.; DEBEVERE, J. Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 26–30, 2003.

FRANCOIS, K.; DEVLIEGHIERE, F.; STANDAERT, A. R.; GEERAERD, A. H.; COOLS, I.; VAN IMPE, J. F.; DEBEVERE, J. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1503-1515, 2005.

- FRIZZO, L. S.; ZBRUN, M. V.; SOTO, L. P.; BERTOZZI, E.; SIGNORINI, M. L.; SEQUEIRA, G. J.; MARTI, L. E.; DALLA SANTINA, R.; PERDIGON, G.; ROSMINI, M. R. Protective effect of an inoculum of lactic acid bacteria from bovine origin against *Salmonella* serotype dublin in the intestinal tract of mice. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, i. 16, p. 2113-2122, 2010.
- GARCÍA-GIMENO, R. M.; MARTÍNEZ, C. H.; SILÓNIZ, M. I. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 19-30, 2002.
- GARRIGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M. Bacteriocinogenic activity of Lactobacilli from fermented sausages. **Journal Applied Bacteriology**, v. 75, p. 142-148, 1993.
- GARRO, M. S.; VALDEZA, G. F.; GIORI, G. S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in purê and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v. 21, p. 511-518, 2004.
- GAY, M.; CERF, O.; DAVEY, K. R. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeriamonocytogenes* at 14°C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 433-438, 1996.
- GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; DEVLIEGHERE, F.; BERNAERT, H.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. F. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modeling. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91 p. 229-44, 2004.
- GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P. Modelagem do Crescimento de Bactérias Láticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados à Vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 1, p. 113-133, 2013.

- GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 101-110, 1998.
- GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 479-490, 1987.
- GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. Molecular identification and characterisation of food-associated lactobacilli. **Italian Journal of Food Science**, v. 12, p. 403-423, 2000.
- GOSPAVIC, R.; KREYENSHIMIDT, J.; BRUCKNER, S.; POPOV, V.; HAQUE, N. Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 290-297, 2008.
- GUERRERO, I.; CHABELA, L. **Meat and Poultry. Spoilage of cooked meats and meat products. Problems caused by bacteria.** In: Robinson, R.; Batt, C.; Patel, P. Encyclopedia of food microbiology. v. 2. Bath: Academic Press. ISBN 0-12-227070-3. p. 1266-1272, 2000.
- HAAKENSEN, M. C.; BUTT, L.; CHABAN, B.; DENEER, H.; ZIOLA, B. horA-specific real-time PCR for detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 65, p. 157-165, 2007.
- HAARMAN, M.; KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2359-2365, 2006.
- HAGEN, R. M.; GAUTHIER, Y. P.; SPRAGUE, L. D.; VIDAL, D. R.; ZYSK, G.; FINKE, E. J.; NEUBAUER, H. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. **Journal of Clinical Pathology Molecular Pathology**, v. 55, n. 6, p. 398-400, 2002.

- HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. **The genus *Lactobacillus***. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). *The genera of lactic acid bacteria*. London: Chapman & Hall, v. 2, 1995.
- 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**, v. 88, p. 682-688, 2011.
- HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 114-123, 2002.
- HELANDER, I. M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 146-150, 1997.
- HUANG, L. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 40-48, 2010.
- HUANG, L.; HWANG, C-A.; PHILLIPS, J. Evaluating the Effect of Temperature on Microbial Growth Rate-The Ratkowsky and a Bełehradek-Type Models. **Journal of Food Science**, v. 76, p. M547-M557, 2011.
- HUANG, L.; TU, S-I.; PHILLIPS, J.; FRATAMICO, P. Mathematical modeling of growth of Non-O157 shigatoxin-producing *Escherichia coli* in raw ground beef. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 4, p. M217-M225, 2012.
- HUDSON, J. A.; MOTT, S. J. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. **Journal of Food Safety**, v. 14, p. 329-339, 1994.
- HUGAS, M. Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation Meat and Meat Products. **Meat Science**, v. 49, p. S139-S150, 1998.

JAMES, S. J.; EVANS, J.; JAMES, C. A review of the performance of domestic refrigerators. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 2-10, 2008.

JANSSEN, M.; GEERAERD, A. H.; LOGIST, F.; DE VISSCHER, Y.; VERECKEN, K. M.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F.; VAN IMPE, J. F. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 59-72, 2006.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução de Eduardo César Tondo, *et al.* 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JEVSNIK, M.; HLEBEC, V.; RASPOR, P. Consumers' awareness of food safety from shopping to eating. **Food Control**, v. 19, p. 737-745, 2008.

JORGENSEN, H. L.; SCHULZ, E. Turbidimetric measurement as a rapid method for the determination of the bacteriological quality of minced meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, p. 177-183, 1985.

JUNEJA, V.; MELENDRES, M.; HUANG, L.; GUMUDAVELLI, V.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. **Food Microbiology**, v. 24, p. 328-335, 2007.

JUNEJA, V. K.; MELENDRES, M. V.; HUANG, L.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H. Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45°C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 106-111, 2009.

KANDHAI, M. C.; REIJ, M. W.; GROGNOU, C.; VAN SCHOTHORST, M.; GORRIS, L. G. M.; ZWIETERING, M. H. Effects of Preculturing Conditions on Lag Time and Specific Growth Rate of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Powdered Infant Formula. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2721-2729, 2006.

- KAO, Y. T.; LIU, Y. S.; SHYU, Y. T. Identification of *Lactobacillus* spp. In probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food Research International**, v. 40, p. 71-79, 2007.
- KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B. Do bacteria need to communicate with each other for growth? **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 237-242, 1996.
- KENNEDY, J.; JACKSON, V.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A.; COWAN, C.; BOLTON, D. J. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1421-1430, 2005.
- KOCH, A. L. **Growth measurement**. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. (Eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 249-277, 1994.
- KOSTINEK, M.; PUKALL, R.; ROONEY, A. P.; SCHILLINGER, U.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2485-2489, 2005.
- KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G-J. E. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 171-184, 2000.
- KOUTSOUMANIS, K. P.; SOFOS, J. N. **Microbial contamination of carcasses and cuts**. In: Jensens, W.K. (Ed.), *Encyclopedia of Meat Sciences*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p. 727-737, 2004.
- KOUTSOUMANIS, K. P.; SOFOS, J. N. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 83-91, 2005.

KOUTSOUMANIS, K.; STAMATIOU, A.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G-J. E. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 124-134, 2006.

KOUTSOUMANIS, K. P.; STAMATIOU, A.P.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G-J. E. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. **Food Microbiology**, v. 25, p. 915-921, 2008.

KOUTSOUMANIS, K. P.; TAOUKIS, P. **Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management**. In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat*. Woodhead, Cambridge, UK, p. 503-561, 2005.

KREYENSCHMIDT, J.; HÜBNER, 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.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.

KWON, H. S.; YANG, E. H.; YEON, S. W.; KANG, B. H.; KIM, T. Y. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 267-275, 2004.

LACK, W. K.; BECKER, B.; KRAMER, J.; HOLZAPFEL, W. H. Turbidimetry as a rapid method for enumeration of microorganisms in raw vegetables. **ArchLebensmittelhyg**, v. 50, p. 136-140, 1999.

- LAGUERRE, O.; FLICK, D. Temperature prediction in domestic refrigerators: Deterministic and stochastic approaches. **International Journal of Refrigeration**, v. 33, p. 41-51, 2010.
- LAMBAIS, M. R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J. C.; BÜLL, R. C.; RODRIGUES, R. R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, v. 312, p. 1917, 2006.
- LI, M. Y.; SUN, X. M.; ZHAO, G. M.; HUANG, X. Q.; ZHANG, J. W.; TIAN, W.; ZHANG, Q. H.. Comparison of mathematical models of lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged raw beef stored at different temperatures. **Journal of Food Science**, v. 78, i. 4, p. M600-M604, 2013.
- LICK, S. Typing systems for lactobacilli. **Milchwissenschaft**, v. 58, p. 256-260, 2003.
- LLAUDES, M. K.; ZHAO, L.; DUFFY, S.; SCHAFFNER, D.W. Simulation and modelling of the effect of small inoculum size on time to spoilage by *Bacillus stearothermophilus*. **Food Microbiology**, v. 18, p. 395-405, 2001.
- LOBACZ, A.; KOWALIK, J.; TARCZYNSKA, A. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in mold-ripened cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3449-3461, 2013.
- LOGAN, J.; EDWARDS, K. **Performing real-time PCR**. In: Logan, J.; Edwards, K.; Saunders, N. (Eds.), Real-time PCR. Current technology and applications. Norfolk. UK: Caister Academic Press, 2009.
- LONGHI, D.A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas**. 2012, 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis. 2012.
- 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. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 88-96, 2013.

LYHS, U. **Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products**. 2002. 81 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia, 2002.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 190-212, 2004.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1292-1305, 2002.

MAKINO, H.; FUJIMOTO, J.; WATANABE, K. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 76-83, 2010.

MANIOS, S. G.; LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N. A generic model for spoilage of acidic emulsified foods: Combining physicochemical data, diversity and levels of specific spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 1-11, 2014.

MANTILLA, S. P. S.; MANO, S. B.; VITAL, H. C.; FRANCO, R. M. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 437-448, 2010.

MARKS, B. P. Status of Microbial Modeling in Food Process Models. **Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 137-143, 2008.

MARTÍN, B.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; PLA, M.; AYMERICH, T. Rapid Quantitative Detection of *Lactobacillus sakei* in Meat and Fermented Sausages by Real-Time PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6040-6048, 2006.

MARTÍN, M. C.; DEL RIO, B.; MARTÍNEZ, N.; MAGADÁN, A. H.; ALVAREZ, M. A. Fast real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages in milk. **Food Microbiology**, v. 25, p. 978-982, 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 in Food Science and Technology**, v. 22, p. 367-376, 2011.
- MASANA, M. O.; BARANYI, J. Growth/no growth interface of *Brochothrix thermosphacta* as a function of pH and water activity. **Food Microbiology**, v. 17, p. 485-493, 2000.
- MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2006. 258 p.
- MATAMOROS, S.; ANDRÉ, S.; HUE, I.; PRÉVOST, H.; PILET, M. F. Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized “foie gras” products. **Meat Science**, v. 85, p. 467-471, 2010.
- MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; VAIDANIS, A.; METAXOPOULOS, I. Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. **Journal of Food Science**, v. 71, p. M157-M167, 2006.
- McCARTNEY, A. L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. S29-S37, 2002.
- McCLURE, P. J.; COLE, M. B.; DAVIES, K. W.; ANDERSON, W. A. The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 277-285, 1993.
- McDONALD, K.; SUN, D. W. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 1-27, 1999.
- McKELLAR, R. C.; LU, X. **Modeling Microbial Response in Food**. CRC series in contemporary food science. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2004.

- McMEEKIN, T. A.; BARANYI, J.; BOWMAN, J.; DALGAARD, P.; KIRK, M.; ROSS, T.; SCHMID, S.; ZWIETERING, M. H. Information systems in food safety management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 181-194, 2006.
- McMEEKIN, T.; BOWMAN, J.; MCQUESTIN, O.; MELLEFONT, L.; ROSS, T.; TAMPLIN, M. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 2-9, 2008.
- McMEEKIN, T. A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D. S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T.; SALTER, M.; SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: a basis for food safety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 541-549, 1997.
- McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. **Predictive Microbiology: Theory and Application**, John Wiley, New York, NY. 1993.
- McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKOSWSKY, D. A.; ROOS, T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 395-407, 2002.
- McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 133-153, 2002.
- MORALES, S. E.; HOLBEN, W. E. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR primer pairs reveals variance in target specificity and efficacy not suggested by in silico analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2677-2683, 2009.
- MYTILINAIOS, I.; SALIH, M.; SCHOFIELD, H. K.; LAMBERT, R. J. W. Growth curve prediction from optical density data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 169-176, 2012.
- NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 41-51, 2000.

NASCIMENTO, F. M. S. **Aplicação da técnica PCR para detecção de bactérias potencialmente patogênicas em um sistema UASB-lagoas de polimento para tratamento de esgoto doméstico.** 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2008.

NAU, R. F. **What's the bottom line? How to compare models.**

Disponível em:

<<http://www.duke.edu/~rnau/compare.htm>>, <http://www.fuqua.duke.edu/faculty_research/faculty_directory/nau/>. Acesso em 23 set. 2013.

NERBRINK, E.; BORCH, E.; BLOM, H.; NESBAKKEN, T. A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 99-109, 1999.

NETER, J.; KUTNER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**, 4th ed. p. 468-474, Chicago, IL:Irwin, 1996.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33^a ed., julho-dezembro, 2004.

NYCHAS, G-J. E.; MARSHALL, D.; SOFOS, J. **Meat poultry and seafood.** In M. P. Doyle, L. R. Beuchat & T. J. Montville, Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, (Chapter 6). ASM press, 2007.

NYCHAS, G-J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, p. 77-89, 2008.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PASCUAL, C.; ROBINSON, T. P.; OCIO, M. J.; ABOABA, O. O.;

MACKEY, B. M. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 257-361, 2001.

PATTERSON, M. F.; MCKAY, A. M.; CONNOLLY, M.; LINTON, M. Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. **Food Microbiology**, v. 27, p. 226-273, 2010.

PERNI, S.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. **Food Microbiology**, v. 22, p. 491-495, 2005.

PIN, C.; GARCÍA DE FERNANDO, G. D.; ORDÓÑEZ, J. A.; BARANYI, J. Analysing the lag-growth rate relationship of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 197-201, 2002.

QUEVEDO, B.; GIERTSEN, E.; ZIJNGE, V.; LUTHI-SCHALLER, H.; GUGGENHEIM, B.; THURNHEER, T.; GMUR, R. Phylogenetic group- and species-specific oligonucleotide probes for single-cell detection of lactic acid bacteria in oral biofilms. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 14, 2011.

RANDAZZO, C. L.; TORRIANI, S.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M.; VAUGHAN, E. E. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of na artesanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1882-1892, 2002.

RASCH, M.; MÉTRIS, A.; BARANYI, J.; BUDDE, B. B. The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p.35-40, 2007.

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

- RAZAVILAR, V.; GENIGEORGIS, C. Prediction of *Listeria spp.* growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in a model broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 149-157, 1998.
- RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, p. 154-160, 1997.
- ROBINSON, T. P.; ABOABA, O. O.; KALOTI, A.; OCIO, M. J.; BARANYI, J.; MACKEY, B. M. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 163-173, 2001.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.
- ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501-508, 1996.
- ROSS, T.; DALGAARD, P. **Secondary models**. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Food*. CRC Press, Boca Raton, pp. 63-150, 2004.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; CARBALLO, J.; COLMENERO, F. J. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. **Meat Science**, v. 75, p. 397-405, 2007.
- SAKALA, R. M.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; HIRATA, T.; MAKINO, Y.; FUKUSHIMA, A. Change in the composition of the microflora on vacuum packaged beef during chiller storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 87-99, 2002.
- SCHULZ, E.; JENSEN, B.; CELERYNOVA, E. Automated turbidimetry for rapid-determination of the bacteriological quality of raw meat and processed meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 219-227, 1988.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 41 °C. **Food Microbiology**, v. 17, p. 329-340, 2000.

SINGH, A. **Dynamic predictive model for the growth of *Salmonella* spp. In liquid whole egg and risk evaluation of egg white hydrolysates manufacturing process for spore formers: *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens***. 2010. 142 p. Dissertation (Master of Food Science and Technology) -University of Nebraska, Lincoln, 2010.

SINGH, S.; GOSWAMI, P.; SINGH, P.; HELLER, K. J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 448-457, 2009.

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

SMELT, J. P. P. M.; OTTEN, G. J.; BOS, A. P. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 207-212, 2002.

SMITH-SIMPSON, S.; CORRADINI, M. G.; NORMAND, M. D.; PELEG, M.; SCHAFFNER, D. W. Estimating microbial growth parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 294-303, 2007.

STEPHENS, P. J.; JOYNSON, J. A.; DAVIES, K. W.; HOLBROOK, R.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HUMPHREY, T. J. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 445-455, 1997.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.

SUTHERLAND, J.P.; BAYLISS, A.J.; BRAXTON, D.S. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperatures, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 29-49, 1995.

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

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

THEVENARD, B.; RASOAVA, N.; FOURCASSIÉ, P.; MONNET, V.; BOYAVAL, P.; RUL, F. Characterization of *Streptococcus thermophilus* two-component systems: In silico analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in pure or mixed culture with its yogurt partner, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 151, n. 2, p. 171-181, 2011.

TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GUILLAMON, J. M. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. **Food Microbiology**, v. 27, p. 257-265, 2010.

VALERO, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; ZURERA, G. Modeling the growth rate of *Listeria monocytogenes* using absorbance measurements and calibration curves. **Food Microbiology and Safety**, v. 71, n. 7, p. M257-M264, 2006.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VAN IMPE, J. F.; POSCHET, F.; GEERAERD, A. H.; VEREECKEN K. M. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1-3, p. 97-105, 2005.

VAN IMPE, J. F.; NICOLAI, B. M.; MARTENS, T.; DE BAERDEMAEKER, J.; VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2901-2909, 1992.

VASSEUR, C.; BAVEREL, L.; HÉBRAUD, M.; LABADIE, J. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 469-476, 1999.

VELUGOTI, P.R.; BOHRA, L.K.; JUNEJA, V.K.; HUANG, L.; WESSELING, A.L.; SUBBIAH, J.; THIPPAREDDI, H. Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. **Food Microbiology**, v. 28, p. 796-803, 2011.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. **International Journal of Food Microbiology**, 96, 149-164, 2004.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, K.; HAMMES, W. P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2578-2585, 2001.

WANG, F.; NISHINO, N. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2380-2387, 2008.

WENG, P. F.; WU, Z. F.; LEI, L. L. Predictive models for growth of *Leuconostoc citreum* and its dynamics in pickled vegetables with low salinity. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, p. 284-291, 2012.

WILSON, P. D. G.; BROCKLEHURST, T. F.; ARINO, S.; THUAULT, D.; JAKOBSEN, M.; LANGE, M.; FARKAS, J.; WIMPENNY, J. W. T.; VAN IMPE, J.F. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unique approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 275-289, 2002.

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

YE, K.; WANG, H.; ZHANG, X.; JIANG, Y.; XU, X.; ZHOU, G. Development and validation of a molecular predictive model to describe the growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged chilled pork. **Food Control**, v. 32, p. 246-254, 2013.

ZHAO, L.; MONTIVILLE, T. J.; SCHAFFNER, D. W. Inoculum size of *Clostridium botulinum* 56A spores influence time-to-detection and percent growth-positive sample. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1369-1375, 2000.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.

ZWIETERING, M. H.; WIT, J. C. de; CUPPERS, H. G. A. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p.204-213, 1994

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Curvas de crescimento isotérmico de *L. plantarum* (Lp), *W. viridescens* (Ws) e *L. sakei* (Ls) nas diferentes temperaturas de incubação testadas

Figura 30 – Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. plantarum* a 30 °C.

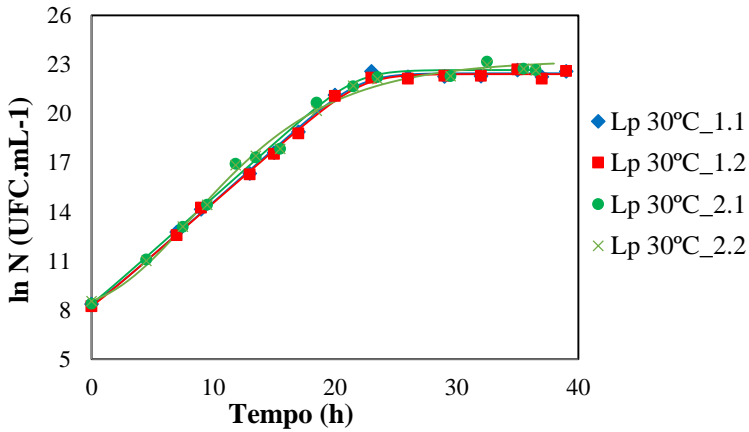


Figura 31 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. plantarum* a 20 °C.

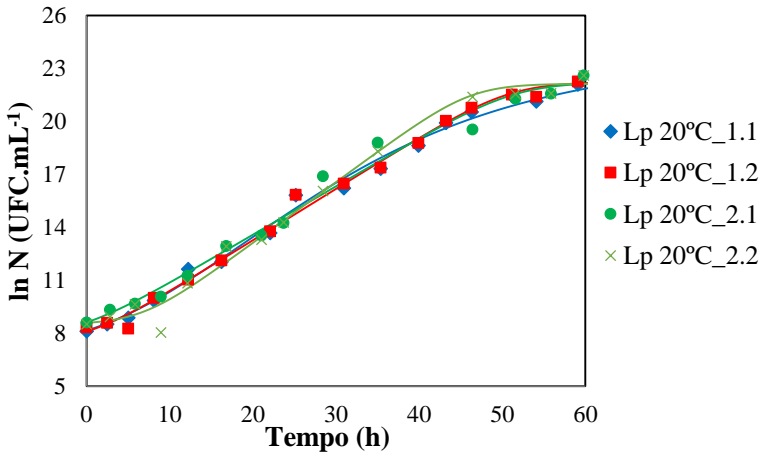


Figura 32 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. plantarum* a 16 °C.

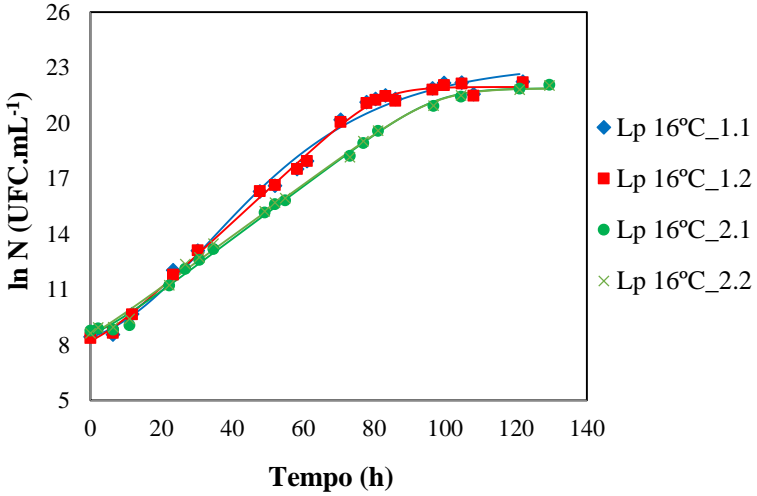


Figura 33 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. plantarum* a 12 °C.

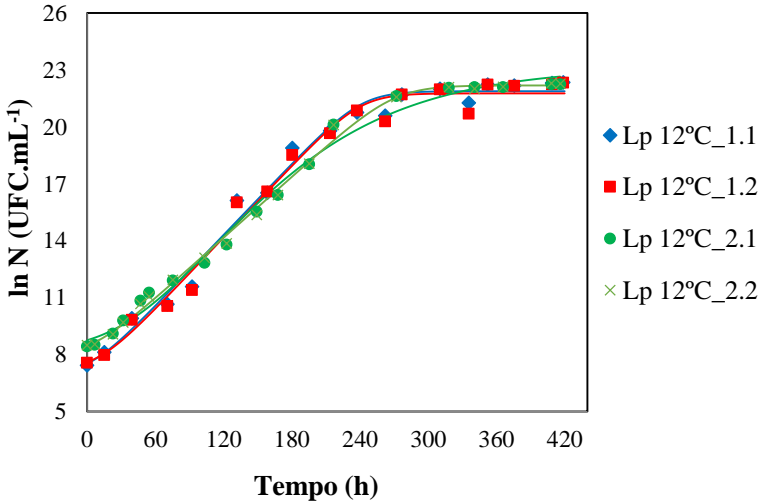


Figura 34 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. plantarum* a 8 °C.

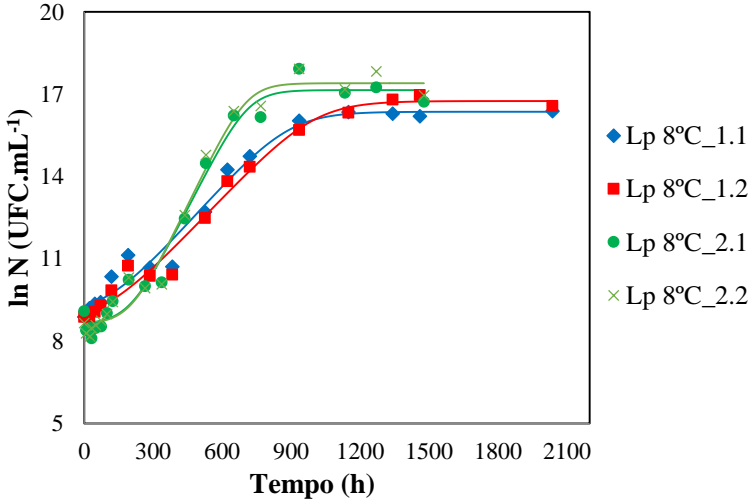


Figura 35 – Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *W. viridescens* a 30 °C.

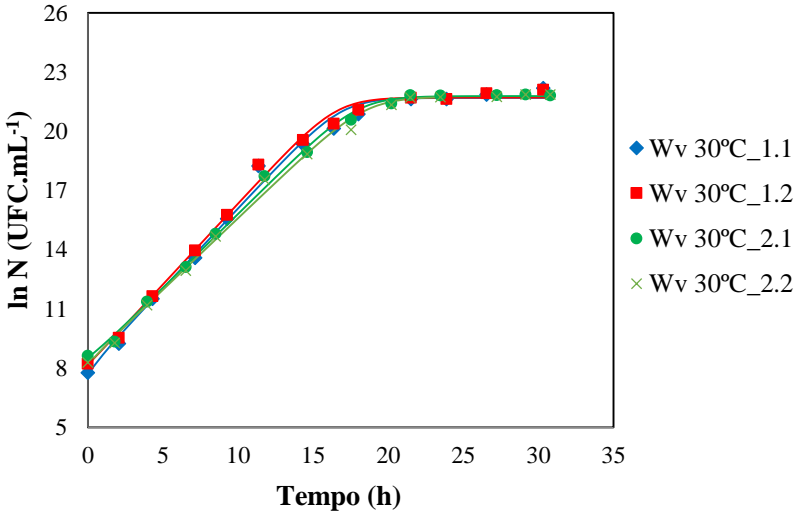


Figura 36 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *W. viridescens* a 20 °C.

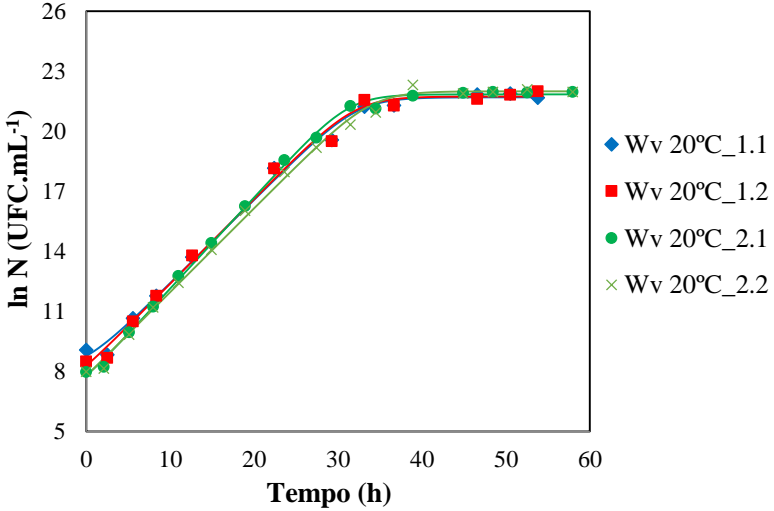


Figura 37 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *W. viridescens* a 16 °C.

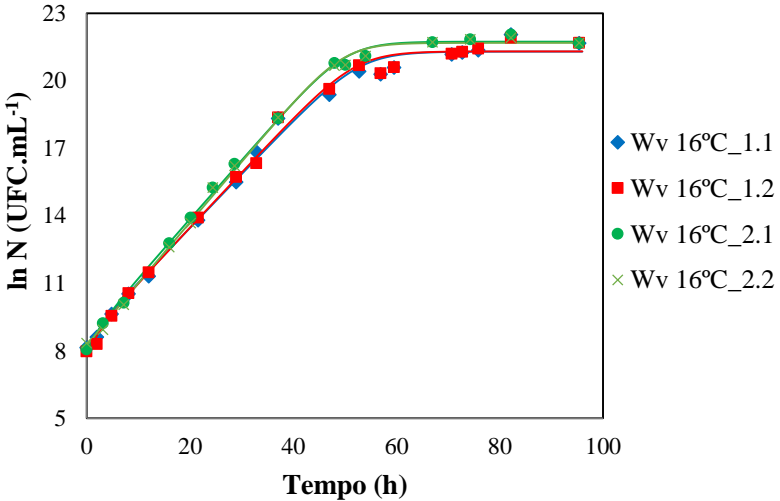


Figura 38 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *W. viridescens* a 12 °C.

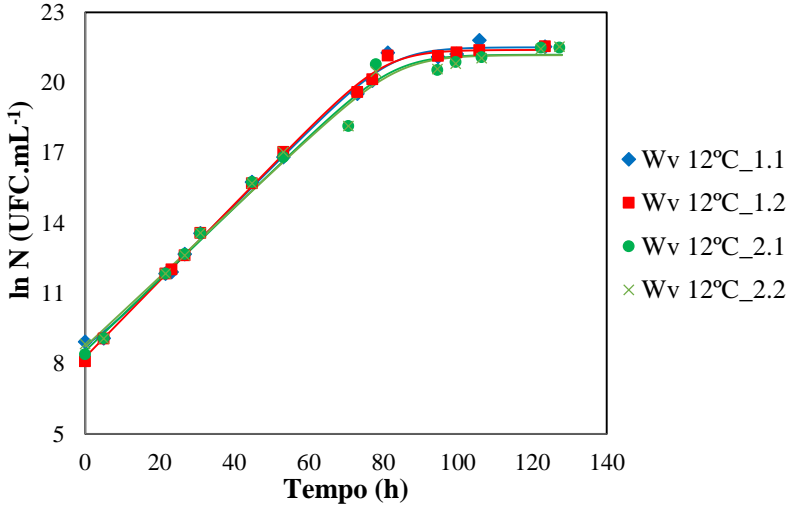


Figura 39 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *W. viridescens* a 8 °C.

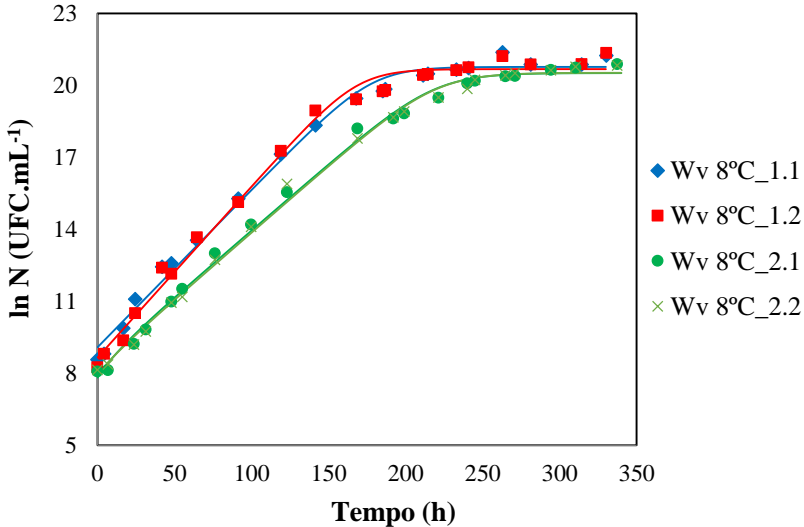


Figura 40 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *W. viridescens* a 4 °C.

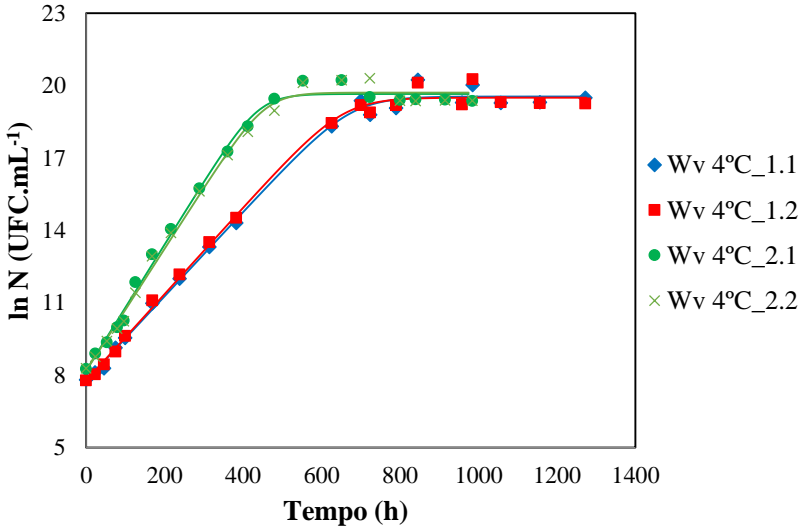


Figura 41 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. sakei* a 30 °C.

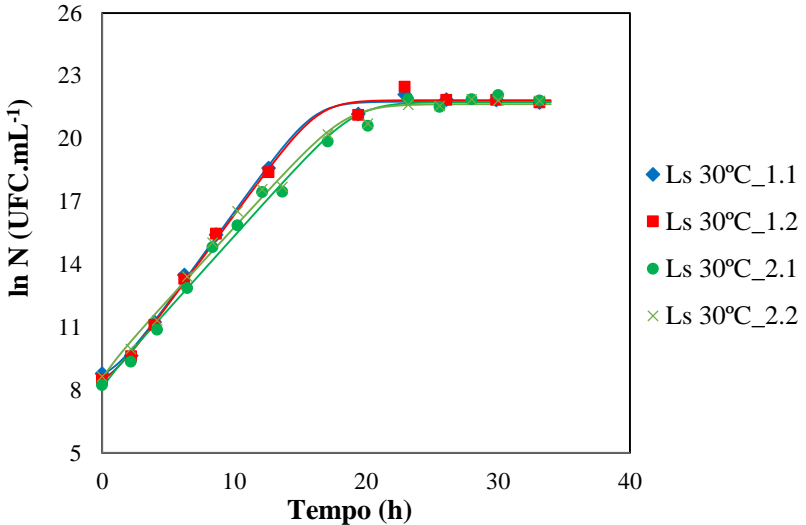


Figura 42 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. sakei* a 20 °C.

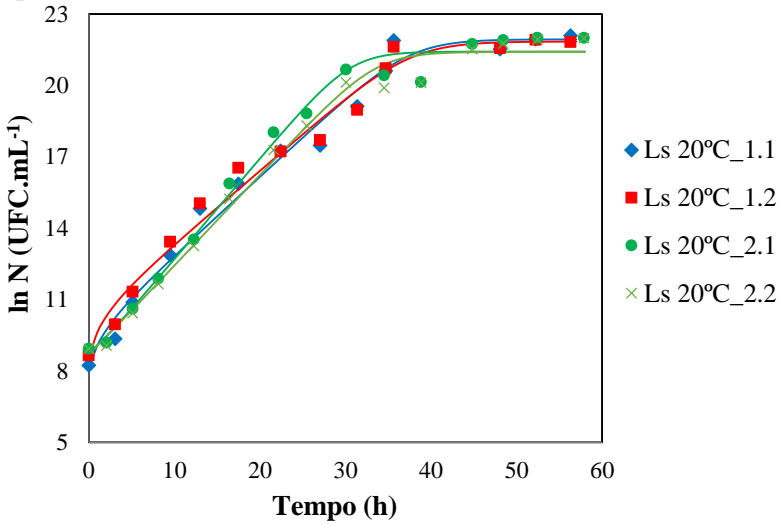


Figura 43 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. sakei* a 16 °C.

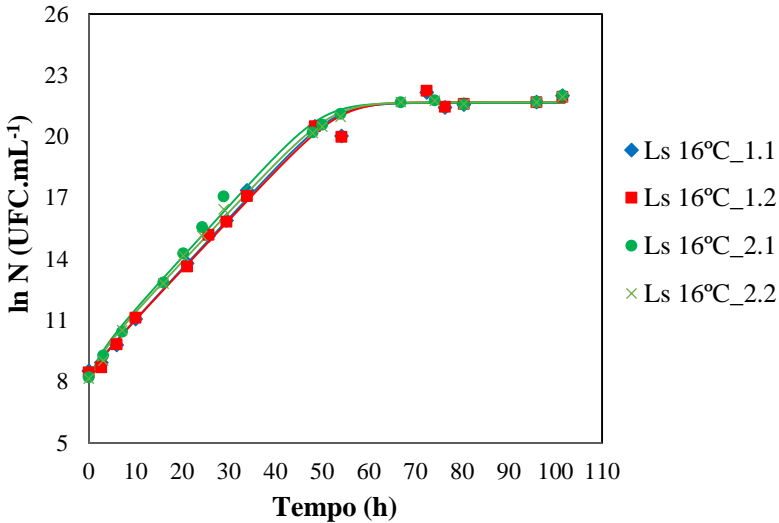


Figura 44 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. sakei* a 12 °C.

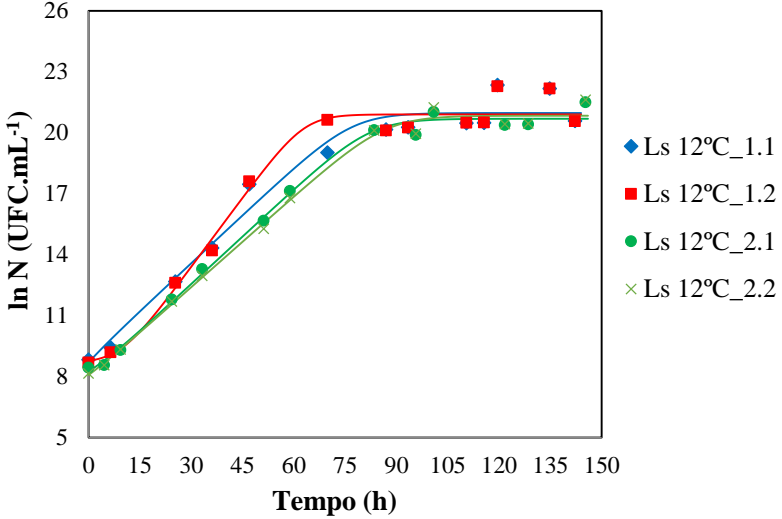


Figura 45 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. sakei* a 8 °C.

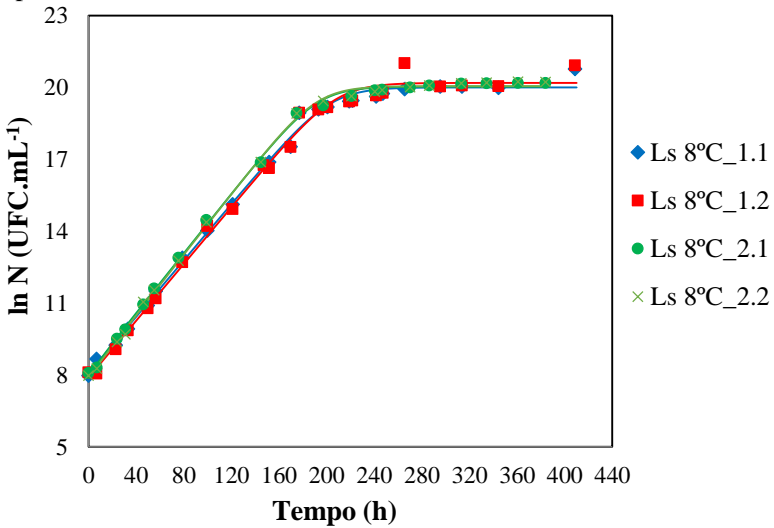
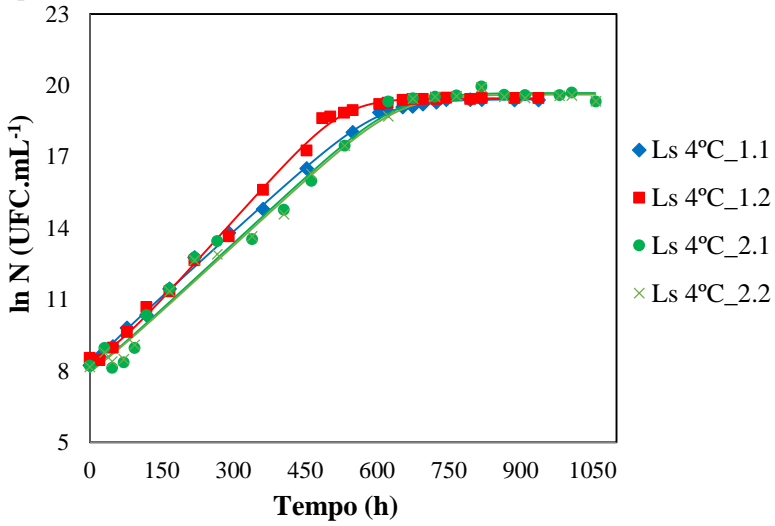


Figura 46 - Ajuste do modelo de BAR (linha contínua) aos dados experimentais (símbolos) das curvas de crescimento de *L. sakei* a 4 °C.



ANEXO

ANEXO I - Meios de Cultura e reagentes utilizados

1) Caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco)

2) Aplicação: meio para cultivo de bactérias ácido lácticas

| | |
|-----------------------------|--------|
| Proteose Peptona Nº 3 | 10,0 g |
| Extrato de carne..... | 10,0 g |
| Extrato de levedura..... | 5,0 g |
| Dextrose..... | 20,0 g |
| Polissorbato 80..... | 1,0 g |
| Citrato de amônia..... | 2,0 g |
| Acetato de sódio..... | 5,0 g |
| Sulfato de magnésio..... | 0,1 g |
| Sulfato de manganês..... | 0,05 g |
| Fosfato dipotássico..... | 2,0 g |

Modo de preparo: dissolver os ingredientes, ajustar o pH e autoclavar a 121°C/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar para cada litro de caldo.

2) Água Peptonada 0,1%

| | |
|-----------------------------|---------|
| Peptona Bacteriológica..... | 1,0 g |
| Água destilada..... | 1000 mL |

Modo de preparo: pesar a peptona, dissolver com água destilada e autoclavar a 121 °C/15min.

3) Tampão de lise

| | |
|--|--------|
| CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)..... | 2% |
| NaCl..... | 1,4 M |
| EDTA..... | 20 mM |
| Tris pH 8,0..... | 100 mM |

Modo de preparo: dissolver os ingredientes, ajustar o pH e autoclavar a 121°C/15min.

4) Etanol 70%

| | |
|--|----------|
| Álcool etílico (CH ₃ CH ₂ OH)..... | 18,75 mL |
| Água destilada..... | 6,25 mL |

Modo de preparo: misturar o volume medido de álcool etílico com o volume de água destilada.