

Danielle de Sousa Severo

**MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE *Leuconostoc  
mesenteroides* EM CULTURA PURA E MISTA USANDO PCR  
quantitativo (qPCR)**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do Grau  
de Mestre em Engenharia de Alimentos  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia Maria  
Falcão de Aragão

Florianópolis  
2018

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

Severo, Danielle de Sousa  
Modelagem do crescimento de *Leuconostoc*  
*mesenteroides* em cultura pura e mista usando PCR  
quantitativo (qPCR) / Danielle de Sousa Severo ;  
orientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão, 2018.  
102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

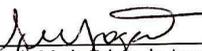
1. Engenharia de Alimentos. 2. *Leuconostoc*  
*mesenteroides*. 3. Bactérias ácido lácticas. 4.  
qPCR. 5. microbiologia preditiva. I. Aragão,  
Gláucia Maria Falcão de. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos. III. Título.

**“MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE *Leuconostoc mesenteroides* EM CULTURA PURA E MISTA USANDO PCR QUANTITATIVO (qPCR)**

Por

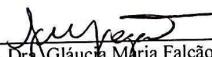
**Danielle de Sousa Severo**

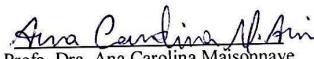
Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão  
**Orientadora**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Gláucia Maria Falcão  
de Aragão

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª. Dra. Ana Carolina Maisonnave  
Arisi

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar  
Carciofi

**Florianópolis, 09 de março de 2018.**

A Deus por ter me guiado até o fim  
Aos meus pais: José Nilton e Maria Marly  
A minha irmã: Denise

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

“Não importa a religião, agradecer sempre será a prece mais bonita que existe.”

Autor desconhecido.

À Deus, por ter me guiado até aqui, por ter me dado força em meio a todas as tribulações no meio do caminho e por ter colocado pessoas tão maravilhosas na minha vida durante esse período.

Aos meus pais José Nilton e Maria Marly e a minha irmã Denise, por oportunizar todos os meus estudos e apoiar todas as minhas decisões, mesmo que fisicamente distantes, me deram toda o amor do mundo para me manter sempre firme e forte.

A minha família, que mesmo de longe tem me dado todo apoio e força para essa conquista, não é fácil está longe de quem sem ama, porém eles se fizeram presentes dentro de mim.

A minha orientadora, Gláucia pelo apoio, disposição, por todo aprendizado adquirido, como aluna e como pessoa, por todo acompanhamento e dedicação e todos os estímulos para a produção deste trabalho.

Ao meu Chefinho Will, que vem me acompanhando desde a minha graduação, aquela pessoa em que eu me espelho, sem ele eu não teria conseguido chegar até aqui, obrigada por todo conhecimento que você me passou, te amo de verdade.

Gostaria de agradecer a todos que fazem parte do ENGEBIO, foi muito bom ter pessoas como vocês ao meu lado, para mim ali não existia equipes divididas em grupos de pesquisa e sim um grupo só, em que a ajuda era mútua, fui muito bem recebia e acolhida por vocês, obrigada a cada um. Em especial as minhas queridinhas Pami, Cami, Naty, Kellen, Carol, Cíntia, Déia, Dê e ao meu IC Charles por toda ajuda, o meu muito obrigada.

Aos meus colegas de turma do mestrado, agradeço a cada um de vocês, pela diversão em cada churrasco, pelos momentos de tensão pré provas e pré seminário, vocês são a melhor turma.

É claro que eu não poderia deixar de agradecer a minhas amigas que são o mais próximo de família que eu tenho aqui em Floripa, aquelas que vieram “lá de cima”, a Milena minha companheira de todas as horas, a Ingrid, Fabíola, Jaízia, Zélia e Natália por todo companheirismo, a Narinha que já foi embora mas que me ajudou muito enquanto esteve perto, amos muito vocês. A todos os amigos que conquistei nesses dois

anos, em especial a minhas garotinhas Nely e Aline por tudo e ao Leno que se tornou um parceiro, vocês são muito especiais.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Arisi e ao Prof. Dr. Bruno Carciofi pela disponibilidade em participar da banca e contribuir com esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Boris Stambuk do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras e ao Laboratório de Farmacologia sob coordenação dos Professores Dr. Anicleto Poli e Dr. Juliano Ferreira pela disponibilidade de utilização de equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho e a CAPES pelo apoio financeiro.

E por fim a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste sonho.

**Muito Obrigada!**

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído”  
(Confúcio)



## RESUMO

Bactérias dos gêneros *Leuconostoc* e *Weissella* estão no grupo de bactérias ácido lácticas (BAL) que são associadas à deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo ou atmosfera modificada e com crescimento sob refrigeração. Estão presentes na microbiota natural desses alimentos e são conhecidas por causar esverdeamento, produção de limo na superfície do produto, perda do vácuo da embalagem, diminuindo a vida útil destes produtos. A utilização da microbiologia preditiva, por meio de modelos matemáticos para estudar o comportamento dessas BAL frente a condições de crescimento variadas, é de fundamental importância para, entre outras finalidades, prever a vida útil dos alimentos em que essas bactérias estejam presentes. Geralmente, para o estudo do crescimento microbiano, são utilizados métodos convencionais de quantificação, como o método de contagem padrão em placas (CPP). Porém, quando se trata da microbiota natural dos alimentos (cultura mista), o emprego de métodos convencionais é limitado, uma vez que não permite a diferenciação entre espécies morfológicamente semelhantes como é o caso das BAL em estudo. O uso de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) combinada com a microbiologia preditiva é uma alternativa pois trata-se de uma técnica que permite essa diferenciação. O presente estudo tem como objetivo comparar o método de CPP com a técnica de qPCR combinados com a microbiologia preditiva para modelar o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em cultura pura e cultura mista, associada à bactéria *Weissella viridescens*. O método de CPP foi empregado para quantificar *L. mesenteroides* em cultura pura, em cinco condições isotérmicas de crescimento (4, 8, 14, 20 e 30 °C). O modelo de Baranyi e Roberts (BAR) foi escolhido para descrever os dados, pois apresentou melhor ajuste, com relação ao modelo de Gompertz modificado (GO). O modelo da raiz quadrada foi selecionado (por apresentar  $R^2$  superior a 0,99) para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro primário velocidade máxima específica ( $\mu_{\text{máx}}$ ). Foi estabelecido um perfil não isotérmico (8-14-8 °C) com a finalidade de simular as variações de temperatura que normalmente ocorrem na cadeia de frios durante o armazenamento e transporte de produtos refrigerados. O método qPCR foi utilizado para quantificação de *L. mesenteroides* em cultura pura nas temperaturas isotérmicas de 4, 8, 14, 20 e 30 °C, com valores para os limites de detecção (LOD) de 2,14; 1,97; 1,88; 3,00 e 1,96 respectivamente. Além disso, o método de qPCR mostrou uma boa

correlação e concordância com os valores de concentração bacteriana (UFC/mL) encontradas no método de CPP e o modelo de BAR apresentou um bom desempenho para descrever os dados de crescimento em cultura pura de *L. mesenteroides*, obtidos pelos dois métodos. Na cultura mista de *L. mesenteroides* e *Weissella viridescens*, o ensaio se mostrou específico para a quantificação e identificação das BAL, com a formação de um único pico de *melting* para *L. mesenteroides* ( $T_m = 82,08 \pm 0,05$  °C) e *W. viridescens* ( $T_m = 80,92 \pm 0,07$  °C). O modelo de BAR apresentou um bom ajuste aos dados de crescimento para as cinco temperaturas e para ambos os métodos CPP e qPCR. Verificou-se que a cepa *W. viridescens* sofreu uma inibição acentuada no crescimento em cultura mista cultivada junto com *L. mesenteroides* à temperatura ótima de crescimento (30 °C), em caldo MRS. O modelo de BAR foi ajustado aos dados do crescimento individual de cada BAL, em que apresentou bom ajuste para *L. mesenteroides*, em cultura mista, porém o modelo não obteve um bom desempenho quando ajustado aos dados de *W. viridescens* em cultura mista, com  $R^2$  de 0,9525. Os resultados obtidos nesse trabalho são muito importantes, tendo em vista a relevância dessas BAL na deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo e sob refrigeração, logo o emprego de metodologias mais rápidas e de alta sensibilidade na identificação e/ou quantificação é de suma importância.

**Palavras-chave:** *Leuconostoc mesenteroides*, bactérias ácido lácticas, cultura mista, qPCR, microbiologia preditiva.

## ABSTRACT

Bacteria of the genus *Leuconostoc* and *Weissella* are in the group of lactic acid bacteria (LAB) that are associated with the spoilage of meat products packaged under vacuum or modified atmosphere and growing under refrigeration. They are present in the natural microbiota of these foods and are known to cause greening, slime production on the surface of the product, loss of packaging vacuum, shortening the shelf life of these products. The use of predictive microbiology, through mathematical models to study the behavior of LAB against varied growth conditions, is of fundamental importance for, among other purposes, to predict a useful life of the foods in which these bacteria are present. Generally, for the study of microbial growth, conventional quantification methods, such as the standard plate counting method (CPP), are used. However, when it comes to the natural food microbiota (mixed culture), the use of conventional methods is limited, since it does not allow the differentiation between morphologically similar species such as the LAB under study. The use of molecular techniques such as Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) combined with predictive microbiology is an alternative because it is the technique that allows this differentiation. The present study aims to compare the CPP method with the qPCR technique combined with the predictive microbiology to model the growth of *Leuconostoc mesenteroides* in pure culture and mixed culture, associated with the bacterial *Weissella viridescens*. The CPP method was used to quantify *L. mesenteroides* in pure culture in five isothermal growing conditions (4, 8, 14, 20 and 30 °C). The Baranyi and Roberts's model (BAR) was chosen to describe the data, since it presented better fit, in relation to the modified Gompertz model (GO). The square root model was selected (for presenting  $R^2$  greater than 0.99) to describe the influence of temperature on the primary parameter specific maximum ( $\mu_{max}$ ). A non-isothermal profile (8-14-8 °C) was established to simulate the temperature variations that normally occur in the cold chain during the storage and transport of refrigerated products. The qPCR method was used for quantification of *L. mesenteroides* in pure culture at isothermal temperatures of 4, 8, 14, 20 and 30 °C, with values for limit of detection (LOD) of 2.14; 1.97; 1.88; 3.00 and 1.96 respectively. In addition, the qPCR method demonstrated a good correlation and concordance with the values of bacterial concentration (CFU / mL) found in the CPP method and the BAR model presented a good performance to describe the growth data in pure culture *L. mesenteroides*, obtained by both methods. In the mixed culture of *L. mesenteroides* and *Weissella viridescens*, the assay

proved to be specific for LAB quantification and identification, with the formation of a single melting peak for *L. mesenteroides* ( $T_m = 82.08 \pm 0.05$  °C) and *W. viridescens* ( $T_m = 80.92 \pm 0.07$  °C). The BAR model presented a good fit to the growth data for the five temperatures and for both CPP and qPCR methods. *W. viridescens* strain was strongly inhibited in growth in mixed culture grown with *L. mesenteroides* at the optimum growth temperature (30 °C) in MRS broth. The BAR model was fitted to the individual growth data of each LAB, in which it presented a good fit for *L. mesenteroides* in mixed culture, but the model did not perform well when fitted to *W. viridescens* data in mixed culture, with  $R^2$  of 0.9525. The results obtained in this work are very important, considering the relevance of these LAB in the spoilage of meat products packaged under vacuum and under refrigeration, so the use of faster methodologies and high sensitivity in the identification and/or quantification is of paramount importance.

**Keywords:** *Leuconostoc mesenteroides*, lactic acid bacteria, mixed culture, qPCR, predictive microbiology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Fases de um ciclo da técnica da PCR. ....	33
Figura 2.2 - Curva Padrão genérica obtida por diferentes amostras de concentrações conhecidas de DNA (1,2 3,4 e 5).....	34
Figura 2.3 - Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo. Parâmetros de crescimento. $\lambda$ (fase lag), $\mu_{\text{máx}}$ (velocidade específica máxima de crescimento), $N_0$ (concentração celular inicial) e $N_{\text{máx}}$ (concentração celular máxima). ....	36
Figura 4.1 Ajuste do modelo de BAR aos dados experimentais das curvas de crescimento de <i>L. mesenteroides</i> nas cinco temperaturas estudadas (A), destaque das temperaturas 14, 20 e 30 °C (B) para melhor visualização. ....	50
Figura 4.2 Modelo secundário que descreve o efeito da temperatura no parâmetro de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ). A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado. ....	53
Figura 4.3 Curva de crescimento de <i>L. mesenteroides</i> sob condições não isotérmicas.....	53
Figura 4.4 Curvas de melting para as diluições seriadas de DNA das curvas padrão de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em cultura pura, nas cinco temperaturas estudadas, 4°C (A), 8°C (B), 14°C (C), 20°C (D) e 30°C (E).....	56
Figura 4.5 Curvas padrão das diluições seriadas de DNA de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em cultura pura nas cinco temperaturas estudadas, 4°C (A), 8°C (B), 14°C (C), 20°C (D) e 30°C (E). ....	59
Figura 4.6 Curvas de melting para as curvas de crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em cultura pura nas cinco temperaturas estudadas, 4°C (A), 8°C (B), 14°C (C), 20°C (D) e 30°C (E), quantidade de DNA (ng) de cada ponto experimental e $T_m$ média para cada curva de crescimento. ....	63
Figura 4.7 Diagramas de regressão linear dos valores log UFC/mL obtidos pelo método CP e qPCR para quantificação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> : 4 °C (A), 8 °C (B), 14 °C (C), 20 °C (D) e 30 °C (E). .	66
Figura 4.8 Concordância entre o método CP e qPCR através da análise de Bland-Altman para quantificação de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> : 4 °C (A), 8 °C (B), 14 °C (C), 20 °C (D) e 30 °C (E). ....	69
Figura 4.9 Curvas de crescimento e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994) aos dados: 4 °C (A), 8 °C (B), 14 °C (C), 20 °C (D) e 30 °C (E). ....	72

Figura 4.10 Curvas de crescimento de *L. mesenteroides* (A) e *W. viridescens* (B) em cultura pura e mista, destaque para a inibição sofrida por *W. viridescens* na cultura mista (*L. mesenteroides* contra *W. viridescens*) (C) e ajuste do modelo de Gompertz modificado (GO)... 79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Iniciadores selecionados para as reações de qPCR.....	43
Tabela 3.2 Modelos secundários avaliados para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro velocidade específica máxima ( $\mu$ ) de crescimento de <i>L. mesenteroides</i> .....	46
Tabela 4.1 Valores dos índices estatísticos RMSE, R <sup>2</sup> , bias e exatidão para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts com $h_0$ fixo e $h_0$ livre e o modelo de Gompertz às curvas de crescimento isotérmico de <i>L. mesenteroides</i> às temperaturas de 4, 8, 14, 20 e 30°C.....	49
Tabela 4.2 Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de BAR (Intervalo de confiança de 95%, em parênteses) ( $h_0 = 0,8423 \pm 0,5$ ) para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> nas diferentes temperaturas de cultivo. ....	51
Tabela 4.3 Equações dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre o parâmetro de crescimento velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ). ....	52
Tabela 4.4 Índices estatísticos do modelo não isotérmico de BAR para o perfil de temperatura (8-14-8 °C) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . ....	54
Tabela 4.5 Valores médios para o teste de especificidade para os pares de iniciadores SCAR utilizando DNA extraído de <i>L. mesenteroides</i> (controle positivo), outras espécies bacterianas e água <i>milli-Q</i> (controles negativos). Os valores de Ct e Tm em negrito indicam os valores para o DNA alvo. ....	57
Tabela 4.6 Valores de LOD encontrados para cada T estudada. ....	61
Tabela 4.7 Parâmetros do ajuste do modelo de BAR aos dados de crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> pelos métodos de CPP e qPCR. ....	74
Tabela 4.8 Índices estatísticos do ajuste de BAR aos dados de crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> pelos métodos de CPP e qPCR. ....	75
Tabela 4.9 Rendimento e Pureza do DNA extraído na curva de crescimento na temperatura 30°C de cultura mista de <i>Leuconostoc mesenteroide</i> e <i>Weissella viridescens</i> .....	76
Tabela 4.10 Valores de Ct e Tm obtidos por qPCR de reação independentes para <i>L. mesenteroides</i> e <i>W. viridescens</i> na temperatura isotérmica de 30 °C. ....	77
Tabela 4.11 Valores dos índices estatísticos RMSE, R <sup>2</sup> , bias e exatidão para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts e o modelo de Gompertz às curvas de crescimento isotérmico de <i>L. mesenteroides</i> e <i>W. viridecens</i> em cultura mista na temperatura isotérmica de 30 °C.....	78

Tabela 4.12 Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz às curvas de crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista na temperatura isotérmica de 30°C..... 80

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- $\mu_{\text{máx}}$  – Velocidade específica máxima  
adm – Adimensional  
 $a_w$  – Atividade de água  
b – Parâmetro empírico  
BAL ou LAB – Bactérias ácido lácticas  
BAR – Modelo de Baranyi e Roberts  
BOD – Estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio  
CCD – dispositivo de carga acoplada  
CPP - Contagem padrão em placas  
Ct – Ciclo *threshold*  
DO – Densidade óptica  
E – Eficiência  
EMA – Corante monoazida de propídio  
F(t) – Função de ajuste  
GO – Modelo primário de Gompertz modificado  
h – Hora  
 $h_0$  – Parâmetro do modelo de Baranyi e Roberts (estado fisiológico da célula)  
IC - Intervalo de confiança  
ISO - Organização Internacional de Normalização  
L – Gênero *Leucnostoc*  
Lb - Gênero *Lactobacillus*  
Lc - Gênero *Lactococcus*  
LOD – Limite de detecção  
Min - minutos  
MRS – Meio de cultivo Man, Rogosa e Sharpe  
N – Concentração microbiana  
 $N_0$  – Concentração microbiana inicial  
 $N_{\text{máx}}$  – Concentração microbiana mínima  
p – Parâmetro a ser descrito pelos modelos secundários  
P – Gênero *Pseudomonas*  
PMA – Corante monoazida de etídio  
q – Parâmetro do modelo de Baranyi e Roberts  
 $q_0$  - Parâmetro do modelo de Baranyi e Roberts  
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa  
Sondas FRET – Sondas de transferência de energia de ressonância de fluorescência  
T – Temperatura (° C)  
 $T_m$  – Temperatura de *melting*

$T_{\min}$  – Temperatura mínima

UFC ou CFU – Unidade formadora de colônia

W - Gênero *Weissella*

$y_{\max}$  – População máxima atingida

$\lambda$  – Duração da fase lag

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1	OBJETIVOS .....	23
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>25</b>
2.1	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).....	25
<b>2.1.1</b>	<b>Espécie <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Espécie <i>Weissella viridescens</i> .....</b>	<b>27</b>
2.2	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS .....	28
2.3	MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BAL.....	29
<b>2.3.1</b>	<b>Métodos convencionais para identificação de BAL.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Métodos moleculares para identificação de BAL.....</b>	<b>30</b>
2.4	PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	31
2.5	MICROBIOLOGIA PREDITIVA .....	34
<b>2.5.1</b>	<b>Modelagem preditiva .....</b>	<b>35</b>
2.5.1.1	Modelos primários de crescimento .....	36
2.5.1.2	Modelos secundários.....	38
2.5.1.3	Modelos dinâmicos – Modelos não isotérmicos .....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1	MICROORGANISMOS E CULTIVO DO PRÉ-INÓCULO ..	40
<b>3.1.1</b>	<b>Condições de cultivo em temperatura isotérmica .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Condições de cultivo em temperatura não isotérmica .....</b>	<b>41</b>
3.2	ELABORAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO .....	42
<b>3.2.1</b>	<b>Método de contagem padrão em placas (CPP) .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Método de PCR quantitativa (qPCR).....</b>	<b>42</b>
3.2.2.1	Extração do DNA.....	42
3.2.2.2	Rendimento e grau de pureza do DNA .....	43
3.2.2.3	Seleção dos iniciadores .....	43

3.2.2.4	Condições de ciclagem .....	43
3.2.2.5	Construção das curvas padrão.....	44
3.3	MODELAGEM MATEMÁTICA .....	45
<b>3.3.1</b>	<b>Modelos primários de crescimento .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Modelos secundários.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Estabelecimento do modelo não isotérmico .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
4.1	AJUSTE DOS MODELOS PRIMÁRIOS AS CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>L. mesenteroides</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS .....	47
<b>4.1.1</b>	<b>Modelos secundários.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Crescimento de <i>L. mesenteroides</i> sob condições não isotérmicas .....</b>	<b>53</b>
4.2	VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE qPCR PARA <i>L. mesenteroides</i> EM CULTURA PURA EM CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS.....	55
<b>4.2.1</b>	<b>Quantificação de <i>L. mesenteroides</i> por CPP e qPCR.....</b>	<b>61</b>
4.2.1.1	Rendimento e pureza do DNA.....	61
4.2.1.2	Especificidade das reações de qPCR .....	62
4.2.1.3	Elaboração das curvas de crescimento por qPCR.....	65
4.2.1.4	Comparação entre os métodos de CPP e qPCR.....	65
4.2.1.5	Ajuste das curvas de crescimento de <i>L. mesenteroides</i> pelos métodos de CPP e qPCR.....	71
4.3	ESTABELECIMENTO DO MÉTODO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DE <i>L. mesenteroides</i> E <i>W. viridescens</i> EM CULTURA MISTA .....	75
<b>4.3.1</b>	<b>Rendimento e qualidade do DNA .....</b>	<b>75</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Ensaio de qPCR para elaboração das curvas de crescimento</b>	<b>76</b>
4.3.2.1	Elaboração das curvas de crescimento.....	76
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>

<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE A – Valores de Ct obtidos para elaboração das curvas padrão. ....</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE B – Rendimento e Pureza do DNA extraído.</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICE C – Valores de Ct e Tm e quantificação (Log UFC/mL) por CPP e qPCR. ....</b>	<b>100</b>
	<b>APÊNDICE D – Valores do parâmetro primário de crescimento <math>h_0</math> do modelo de BAR para os métodos de CPP e qPCR. ....</b>	<b>104</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As Bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo altamente associado à deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo, causando o esverdeamento, produção de limo na superfície e formação de odores indesejáveis (VELD, 1996). BAL do gênero *Leuconostoc* são capazes de crescer sob diferentes condições de armazenamento como, embalagens a vácuo, embalagens com atmosfera modificada e refrigeração (POTHAKOS et al., 2015). Diversos autores identificaram as BAL *Weissella viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides* como espécies importantes na deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo e sob refrigeração (DIEZ et al., 2009; GÓMEZ-ROJO et al., 2015; KAMENÍK et al., 2015). Dada à relevância dessas bactérias em produtos cárneos, estudar a dinâmica de crescimento de BAL deteriorantes é de grande interesse.

A microbiologia preditiva tem sido uma ferramenta bastante empregada, que através de modelos matemáticos descrevem o comportamento microbiano. Dentre esses modelos têm-se o modelo de Baranyi e Roberts (1994) e o modelo de Gompertz modificado descrito por Zwietering et al. (1990). Alguns autores reportam em seus estudos a utilização desses modelos para avaliar o crescimento de BAL em condições diversas como: *Weissella viridescens*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc mesenteroides* em condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo (CAMARGO, 2015; DALCANTON, 2010; GARCÍA-GIMENO et al., 2005). Porém, todos esses estudos foram realizados aplicando os métodos microbiológicos convencionais como contagem padrão em placas (CPP) e/ou o método turbidimétrico da densidade óptica (DO), métodos estes que não permitem a diferenciação de cepas morfologicamente semelhantes (cultura mista). A utilização de técnicas moleculares tem sido uma alternativa para quantificação de BAL em alimentos, pois permitem essa diferenciação.

Modelos preditivos para descrever o comportamento de bactérias ácido lácticas (BAL) deteriorantes de produtos cárneos foram aplicados por diversos estudos no nosso grupo de pesquisa. Os dados de crescimento para a modelagem foram obtidos por técnicas dependentes de cultivo, como o método de contagem em placas e absorbância. Assim, a introdução de técnicas independentes de cultivo, como o uso da técnica de qPCR para gerar dados quantitativos do crescimento dessas BAL foi proposto por Camargo (2016). Nessa nova abordagem, a técnica de SYBR Green qPCR foi utilizada para identificação e quantificação de

*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* e *Weissella viridescens* em meio de cultivo. No entanto, os iniciadores selecionados da literatura não apresentaram a especificidade necessária para amplificação das BAL. Assim, trabalhos em andamento (dados não publicados) projetaram iniciadores específicos para identificação de *L. plantarum* em meio de cultivo. Além disso, iniciadores e sondas TaqMan foram investigadas na literatura para identificação e quantificação de *W. viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides* em produto cárneo embalado a vácuo (dados não publicados).

O método da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) vem sendo bastante empregado por ser um método que apresenta um grande potencial devido à sua alta especificidade e sensibilidade (NOGVA et al., 2000; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2004). A utilização dessa técnica para quantificação e detecção de BAL em cultura pura e cultura mista tem sido utilizada em vários estudos (ACHILLEOS; BERTHIER, 2017; ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008; MOSER et al., 2017). Não há relatos na literatura sobre a utilização do método de qPCR combinado com a modelagem preditiva, para quantificação de BAL deteriorantes de produtos cárneos, em cultura pura e cultura mista, sob condições de crescimento variadas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Modelar o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* em cultura pura e mista, associada com *Weissella viridescens*, por meio do uso da técnica de PCR quantitativo (qPCR), comparando com o método convencional de contagem.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Definir as condições da qPCR para quantificação de *Leuconostoc mesenteroides* em cultura pura e mista e obtenção das curvas padrão que relacionam qPCR com CPP;
- Elaborar curvas de crescimento da cultura pura de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* em diferentes condições isotérmicas (4, 8, 14, 20 e 30°C) por meio da enumeração por contagem padrão em placas (CPP), em comparação com a quantificação por PCR quantitativo (qPCR);
- Estabelecer modelos secundários que descrevam a influência da variação da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de *L. mesenteroides*;
- Estabelecer o modelo dinâmico de crescimento de *L. mesenteroides* em condições não isotérmicas, a partir dos modelos primário e secundário selecionados;
- Elaborar as curvas de crescimento de *L. mesenteroides* e *Weissella viridescens* em cultura mista sob condições isotérmicas por CPP e qPCR;
- Ajustar modelos preditivos as curvas obtidas pelos métodos de contagem padrão em placas e qPCR para a obtenção parâmetros de crescimento de *L. mesenteroides* em cultura pura e mista nas diferentes condições testadas.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

As BAL apresentam características morfológicas, fisiológicas, metabólicas e bioquímicas comuns, podendo ser classificadas como gram-positivas, não formadoras de esporos, microaerófilas, anaeróbias facultativas e apresentam-se na forma de cocos ou bacilos. São geralmente mesófilas, pois têm a temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 35 °C, podendo se desenvolver numa ampla faixa de temperatura (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; AXELSSON, 2004; MASSAGUER, 2006; LEITE, 2006 ).

Este grupo é constituído por 15 gêneros sendo estes: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* ( JAY, 2005 e MAYO; SINDEREN; VENTURA, 2008 ).

Segundo Jay (2005), com base nas vias de fermentação das hexoses, os gêneros de BAL são classificados em duas categorias: homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como produto principal da fermentação de glicose, nesta classificação estão incluídos os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*. Os gêneros pertencentes ao grupo das heterofermentativas são: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e *Lactobacillus*, que produzem outros produtos da fermentação além de ácido láctico, que incluem dióxido de carbono, ácido acético e etanol.

Bactérias deste grupo incluem uma grande parte da microflora probiótica, como *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, e *Pediococcus*, que são importantes gêneros de BAL ligados a alimentos e produtos fermentados, como produtos cárneos, vegetais, produtos de leite, bebidas e produtos panificação (O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002).

Algumas BAL possuem propriedades inibidoras, capazes de produzir uma série de substâncias que restringem o desenvolvimento das populações bacterianas e podem agir como concorrentes ou inibidores de outros microrganismos deteriorantes (GHANBARI et al., 2013).

Comi et al. (2016), em seu estudo utilizaram BAL como culturas bio-protetoras (*Lc. lactis* e *Lb. Sakei*) para inibir o crescimento de *L. mesenteroides* inoculada artificialmente em bacon cozido comercial, com a finalidade de aumentar a vida útil desse produto. Foi observado que, ao longo de 90 dias, as amostras com as culturas bio-protetoras não

apresentaram esverdeamento, produção de limo e estufamento das embalagens, que havia sido observado no produto sem as culturas.

Apesar da sua grande importância na preservação dos alimentos, interferindo na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de mecanismos como: competição por oxigênio, produção de substâncias antagonicas como a produção de bacteriocina, entre outros (AMMOR et al., 2006; BURGAIN et al., 2014), esse grupo de bactérias necessita de atenção em relação à sua capacidade de deteriorar alimentos. Os principais aspectos que caracterizam a deterioração da carne devido à produção de metabólitos são: mudanças na textura, aparência e sabor, produção de odores indesejáveis e formação de limo na superfície do produto (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; CAYRÉ; GARRO; VIGNOLO, 2005; NYCHAS et al., 2008; SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000).

As principais BAL deteriorantes de alimentos são do gênero *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (AXELSON, 1993; JONES, 2004; LEISNER et al., 2000). Dentre esses gêneros, *Carnobacterium*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são importantes deteriorantes da carne crua refrigerada (LABADIE, 1999).

BAL dos gêneros *Leuconostoc* e *Weissella* são encontrados associados com uma ampla variedade de produtos à base de carne, incluindo a carne fresca e embalados sob vácuo, aves, assim como produtos de carne processada e fermentadas (REUTER, 1975 ; VON SANTO e HOLZAPFEL, 1989).

### 2.1.1 Espécie *Leuconostoc mesenteroides*

Bactérias do gênero *Leuconostoc* são espécies de BAL heterofermentativas, produtoras de compostos como CO<sub>2</sub>, compostos aromáticos (diacetil, acetoína, acetato, etanol e 2, 3-butilenoglicol), sendo largamente utilizadas pela indústria para produção de diversos alimentos fermentados e estão geralmente dispostas na forma de cocos, muitas vezes formando cadeias durante o seu crescimento exponencial (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004; KUBISTA et al., 2006; MACEDO; MALCATA, 1997; VAN HYLCKAMA VLIJG; HUGENHOLTZ, 2007; VEDAMUTHU, 1988).

*L. mesenteroides* foi descrito pela primeira vez por van Tieghem (1978) como anaeróbia facultativa, mesófila, imóvel e não formadora de esporos e na natureza existem em diversos produtos alimentares como

produtos lácteos, produtos de carne, de vinho e vegetais (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004).

Frequentemente isolado em produtos à base de carne, embalados a vácuo ou atmosfera modificada, *L. mesenteroides* é uma BAL que requer atenção, por contribuírem para o processo de deterioração destes produtos, causando a diminuição do pH e provocando o aparecimento de odores e sabores estranhos (VELD, 1996; ZHANG; HOLLEY, 1999).

Vários estudos relatam que, nos estágios iniciais após a embalagem dos alimentos, os níveis de *L. mesenteroides* geralmente são muito baixos para serem detectados diretamente em uma população mista por métodos convencionais de contagem, no entanto, eles se tornam as principais espécies durante o armazenamento, resultando em deterioração (HAMASAKI et al., 2003; JONES, 2004; YOST; NATTRESS, 2000).

Os métodos convencionais para detectar *L. mesenteroides* em alimentos requerem isolamento de colônias, geralmente realizada em meio de Man Rugosa e Sharpe (MRS) e, subsequentemente, uma série de isolados devem ser identificados por meio de testes bioquímicos, morfológicos e fisiológicos. Além de ser trabalhoso, métodos baseados em cultura são limitados pela sua baixa sensibilidade, derivada a partir de colônias escolhidas aleatoriamente e, frequentemente, ocorrem erros de identificação. Espécies de *Leuconostoc* apresentam muitas características fenotípicas e têm necessidades de crescimento complexos, dificultando a sua identificação por testes fenotípicos. Em contraste, os processos baseados em PCR são capazes de detectar uma bactéria específica em populações mistas, mesmo que represente apenas uma percentagem mais baixa, geralmente inferior a 1% da população (ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008; MATSUKI et al., 2002).

### **2.1.2 Espécie *Weissella viridescens***

O gênero *Weissella* recebeu o nome do microbiologista alemão Norbert Weiss, conhecido por suas muitas contribuições no campo da pesquisa de bactérias de ácido lácticas (Collins et al., 1993). Como a descrição original do gênero por Collins et al. (1993), foram descritas várias novas espécies do gênero, de modo que o mesmo atualmente compreende 19 espécies validadas. As bactérias pertencentes ao gênero *Weissella* são difíceis de diferenciar das espécies dos gêneros *Leuconostoc* e/ou *Lactobacillus* heterofermentativos com base apenas nas características fenotípicas (FUSCO et al., 2015).

Representantes do gênero são anaeróbias facultativas com um metabolismo obrigatoriamente fermentativo, não possuem citocromos e

fermentam a glicose heterofermentativamente através das vias hexose-monofosfato e fosfoacetolase. Os produtos finais da fermentação da glicose incluem ácido láctico (com algumas espécies que produzem apenas D (-) e outros enantiômeros D (-) e L (+) ácido láctico, CO<sub>2</sub> e etanol e/ou acetato (FUSCO et al., 2015)

*W. viridescens* está associada a diferentes tipos de alimentos como, por exemplo, vegetais, legumes, mandioca e silagem, bem como em carnes e produtos cárneos, além de ter potencial probiótico (COMI; IACUMIN, 2012; DOULGERAKI et al., 2012; FUSCO et al., 2015; HAN et al., 2011; PATTERSON et al., 2010).

Apesar da sua influência positiva na preparação de produtos fermentados, numerosos estudos têm associado *W. viridescens* com os processos de deterioração em produtos à base de carne, tais como o aparecimento de manchas verdes na sua superfície ( COMI et al., 2007; JAY, 2000; NIVEN; EVANS, 1956; PEIRSON; GUAN; HOLLEY, 2003; SCHILLINGER et al., 2006).

As BAL do gênero *Weissella* são conhecidas por causar deterioração em produtos cárneos embalados a vácuo, mesmo sob condições de refrigeração, ocasionando a diminuição da vida útil desses produtos (MENEZES et al., 2018; SILVA, 2015).

## 2.2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO EM ALIMENTOS

A temperatura é um dos fatores extrínsecos mais importantes para o controle de crescimento de microrganismos, pois pode variar durante a cadeia de produção e distribuição de alimentos perecíveis, sendo que a exposição a diferentes temperaturas pode comprometer a qualidade do produto (FU; LABUZA, 1992; IMPE; MARTENS; BAERDEMAEKER, 1992; TREMARIN, 2013).

A cadeia de frio é um conjunto de etapas de refrigeração que tem como objetivo manter a qualidade e segurança dos alimentos, desde a produção, conservação até o consumo. Apesar de ser de extrema importância para a segurança e qualidade de alimentos perecíveis, a manutenção da cadeia de frio requer um consumo alto de energia, gerando implicações econômicas para a indústria e para o comércio de alimentos, com os custos em eletricidade representando uma parte considerável dos custos totais de produção (GWANPUA et al., 2015).

Segundo Nantes e Machado (2005), as temperaturas de refrigeração e congelamento de supermercados e frigoríficos não são

mantidas ideais pelos técnicos responsáveis, gerando assim, uma grande problemática para os alimentos armazenados nestas condições. Assim, para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos, a temperatura precisa ser cuidadosa e continuamente monitorada e controlada em cada etapa da cadeia de abastecimento (MONTANARI, 2008).

Murmann et al. (2004) em seu estudo investigaram o controle da temperatura de armazenamento de alimentos congelados e mantidos sob refrigeração em 45 estabelecimentos do sul do Brasil, e observaram que 57% dos equipamentos estavam com a temperatura acima do permitido, além de encontrar refrigeradores com temperatura de 22°C.

A maioria dos microrganismos, patogênicos ou não, causam deterioração em carnes refrigeradas embaladas a vácuo, por serem mesófilos com características psicrotróficas e anaeróbias facultativas, como por exemplo, as bactérias ácido lácticas, que têm sido identificadas como microrganismos deteriorantes de carne bovina e de frango embalados a vácuo, e são frequentemente isoladas destes tipos de produto por serem tolerantes ao CO<sub>2</sub> e a baixas temperaturas (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; DAINY et al., 1983).

### 2.3 MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BAL

A quantificação da concentração celular em um meio de cultura é essencial para a determinação da cinética e estequiometria do crescimento microbiano. Os métodos convencionais podem ser classificados em duas categorias: diretos e indiretos. Em muitos casos, o uso de métodos diretos não é possível devido à presença de sólidos suspensos ou outros compostos interferentes no meio (STREMEL et al., 2013).

Nas últimas décadas, a pesquisa em ciência dos alimentos foi além das metodologias convencionais e tem avançado para tecnologias, especialmente ferramentas moleculares, que têm sido bem estabelecidas nos ramos da medicina, farmacologia e biotecnologia (MOCO et al., 2006).

#### 2.3.1 Métodos convencionais para identificação de BAL

Os métodos convencionais para a identificação de BAL consistem no enriquecimento de culturas seguido de ensaios de confirmação, centrados nas propriedades metabólicas e antigênicas do microrganismo a ser identificado. As principais vantagens da aplicação destes tipos de métodos são o fato de serem parcialmente baratos e

tecnicamente simples. As principais desvantagens referem-se ao fato de serem demorados e susceptíveis a contaminações cruzadas (YENI et al., 2014).

Os métodos convencionais mais empregados são: métodos turbidimétricos e contagem padrão em placa (CPP).

A análise espectrofotométrica da densidade óptica (DO) é um método turbidimétrico simples e rápido, mas não permite distinguir entre células viáveis e não viáveis, não permite a obtenção direta dos valores da concentração celular, apresenta uma baixa sensibilidade, sendo um método utilizado principalmente quando se pretende confirmar se uma dada cultura se encontra em crescimento (STREMEL et al., 2013). Além disso é um método incapaz de detectar concentrações bacterianas inferiores a  $10^6$  UFC/mL.

O método de contagem padrão em placas (CPP) é a técnica mais utilizada na determinação da concentração de uma população bacteriana. A vantagem desse método em relação ao método da densidade óptica (DO) é sua capacidade de quantificar apenas células viáveis, no entanto possui algumas desvantagens, além de ser uma técnica demorada, tendo em vista que o tempo de incubação, no geral é entre 24 e 48 h, para o aparecimento das colônias viáveis em placas, é uma técnica que não distingue colônias morfológicamente semelhantes (como por exemplo, uma cultura mista de BAL).

### **2.3.2 Métodos moleculares para identificação de BAL**

Por muito tempo, as BAL foram classificadas por suas características fenotípicas, tais como: morfologia, fermentação de carboidratos, variação na temperatura de crescimento, fermentação de glicose, entre outras. A identificação e quantificação de BAL, presentes em microbiota natural (cultura mista), pela utilização de métodos convencionais como medida de absorvância e contagem em placas não é possível devido ao fato dessas apresentarem a mesma morfologia, apresentando resultados idênticos frente a estas análises. Porém, com o melhoramento nos métodos moleculares, novas técnicas surgiram para aumentar e potencializar a identificação de bactérias muito semelhantes (CAMARGO, 2015; SANTOS, 2012).

Inúmeros métodos são utilizados para uma rápida e precisa identificação e diferenciação das BAL. Para obter uma identificação precisa, técnicas fenotípicas e genotípicas são frequentemente combinadas em uma abordagem polifásica, onde as deficiências de um

método é compensado pelo uso de outro método (DE BRUYNE et al., 2009).

Segundo Sant'anna (2014), as principais técnicas para identificação de BAL fundamentadas em métodos moleculares estão relacionadas ao sequenciamento e/ou amplificação de sequências altamente conservadoras nos genes.

Em microbiologia de alimentos, a primeira aplicação independente de métodos moleculares para quantificação e/ou identificação bacteriana em matriz alimentar fermentada foi descrita em 1999 (AMPE; BEN OMAR; GUYOT, 1999). Métodos baseados em PCR quantitativo são utilizados para detectar, identificar e quantificar microrganismos patogênicos, deteriorantes ou populações benéficas, tais como microrganismos fermentadores ou probióticos (LE DRÉAN et al., 2010; MALORNY et al., 2008; MASCO et al., 2007).

## 2.4 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

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

Com a invenção dessa técnica, em 1993, por Higuchi e colaboradores (HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, 1993), foi possível monitorar em tempo real a quantidade de produto formado ao longo da reação de PCR. A primeira qPCR foi realizada por simples adição de brometo de etídio na mistura da reação de PCR e acompanhamento da amplificação através das propriedades fluorescentes (HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH PS, 1992). Para aumentar a sensibilidade, brometo de etídio foi posteriormente substituído pelo corante SYBR Green (SCHNEEBERGER, SPEISER e ZEILLINGER, 1995).

A técnica foi implementada com o desenvolvimento de um equipamento que, ao acoplar uma câmara de vídeo CCD (do inglês, *charge-coupled device*), de modo a monitorar a PCR durante todos os ciclos, podiam detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas. Atualmente, a qPCR requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador, com sistema ótico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com

*software* próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (OLIVEIRA, 2009).

Há vários sistemas utilizados para detecção de sequências-alvo, tais como sistemas de corante inespecífico (SYBR Green, EVA Green, SYTO), tecnologias baseadas em iniciadores (primer LUX, AmpliFluor, Plexor) e sistemas de sondas FRET do inglês “fluorescence resonance energy transfer” (sondas TaqMan ou sondas de hidrólise, molecular beacons, Scorpions, sondas de hibridização FRET), entre outros (OLIVEIRA, 2015).

Um dos corantes intercalantes mais utilizados na amplificação por qPCR é o SYBR Green I que se liga, inespecificamente, à dupla fita de DNA e não se liga à fita simples. Assim, o aumento da quantidade do DNA sintetizado resulta em um aumento do sinal fluorescente. A maior limitação do sistema de quantificação que utiliza o SYBR Green I é a inespecificidade, já que toda fita dupla de DNA formada é amplificada, incluindo produtos não específicos e dímeros de iniciadores. Entretanto, a análise da curva de dissociação térmica característica dos produtos amplificados é uma ferramenta que auxilia na especificidade para a análise dos resultados (WEIGHARDT, 2007).

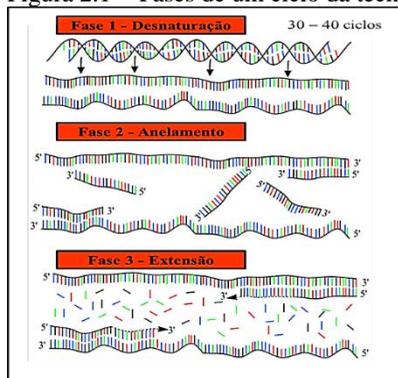
A tecnologia SYBR® Green é baseada em moléculas que se ligam às duplas cadeias de DNA e, quando excitadas, emitem uma fluorescência verde. As moléculas não ligadas deste composto apresentam uma fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo, que é utilizado como “ruído de fundo”. Durante a qPCR, após o reconhecimento dos iniciadores, as moléculas de SYBR® Green ligam-se às duplas cadeias de DNA pré sintetizadas pela enzima Taq DNA polimerase. Assim, ao longo da reação e no fim da fase de extensão, de cada ciclo, pode ser monitorizada a quantidade crescente de fluorescência e, conseqüentemente, de DNA amplificado (OLIVEIRA, 2009; VITZTHUM et al., 1999).

O princípio geral da PCR, apresenta-se em três fases características: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária (KUBISTA et al., 2006). Os produtos de reação são analisados em um estágio inicial do processo de amplificação, quando a reação ainda está na fase exponencial, onde se prevê uma eficiência de aproximadamente 100%, ou seja, é nesta fase que a relação entre a quantidade de produto e do *input* de DNA é, provavelmente, mais consistente, permitindo uma quantificação mais precisa do que a do final da reação (HEID et al., 1996; OLIVEIRA, 2009 e STRACHAN e READ, 2013).

Existe um ponto onde a reação vai atingir o limiar da fase exponencial, no qual o nível de fluorescência vai exceder um limiar arbitrário, definido por um *software* da qPCR. Este ponto corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável, ou seja, que atrevesse o limiar estabelecido que é definido como *cycle threshold* (Ct) (HEID et al., 1996; KUBISTA et al., 2006).

A PCR consiste em ciclos consecutivos que são divididos em três fases: desnaturação, anelamento e extensão (Figura 2.2), que dependem da variação de temperatura. Na primeira fase, ocorre a desnaturação da dupla hélice de DNA por aquecimento, originando duas fitas simples. Na fase de anelamento, a temperatura é reduzida para que os iniciadores se anelem às fitas simples de DNA. Enquanto na fase de extensão, a temperatura é elevada para que a enzima DNA polimerase tenha sua atividade máxima, permitindo a extensão dos iniciadores e a formação de novas fitas de DNA.

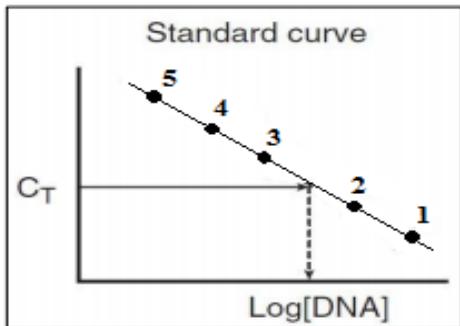
Figura 2.1 - Fases de um ciclo da técnica da PCR.



Fonte: Adaptado de VIERSTRAETE (1999).

A quantificação do número exato de moléculas é feita a partir de uma curva padrão, obtida após análises em amostras de concentração conhecida. Para isto, os valores de Ct são projetados num gráfico Ct *versus* o logaritmo da concentração de DNA (concentração conhecida), como apresentado na Figura 2.3 (PELT-VERKUIL et al., 2008).

Figura 2.2 - Curva Padrão genérica obtida por diferentes amostras de concentrações conhecidas de DNA (1,2,3,4 e 5).



Fonte: Adaptado de Butler,(2005).

Atualmente, o uso da técnica qPCR tem sido comumente utilizada para identificação de BAL em produtos fermentados: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* em queijos (ACHILLEOS; BERTHIER, 2017), *Lactobacillus paracasei* em iogurte (ILHA et al., 2016). *Weissella viridescens* em morcillas (GÓMEZ-ROJO et al., 2015), *Leuconostoc mesenteroides* na fermentação de kimchi (JUNG et al., 2012), detecção de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* em fermentação de grãos de cacau (SCHWENDIMANN et al., 2015).

## 2.5 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva pode ser definida como uma área de pesquisa que utiliza modelos matemáticos para descrever a dinâmica populacional (crescimento e/ou inativação) de microrganismos submetidos a complexas mudanças físicas, químicas e biológicas durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos (HUANG, 2014).

Os modelos de microbiologia preditiva são diversos e ajudam a responder a muitas perguntas feitas pela indústria de alimentos e avaliadores de risco: qual é o potencial de crescimento durante o resfriamento? qual é a eficácia do processo de pasteurização? qual é a dose para quais consumidores estão expostos no final da vida útil? (GUILLIER, 2016).

A microbiologia preditiva tem potencial para se tornar uma ferramenta ainda mais importante, dando suporte à segurança microbiológica dos alimentos. Modelos mais precisos podem ser gerados através de novos métodos analíticos que facilitam a caracterização rápida de microrganismos, bem como a aquisição de um grande conjunto de dados. Como exemplo de avanços recentes, pode-se destacar o emprego de modelos biologicamente interpretáveis que retratam novos parâmetros ambientais, modelos que levam em conta a interação microbiana em alimentos, a introdução de métodos analíticos e o uso de técnicas moleculares que irão ajudar a caracterizar a variabilidade genética observada entre as espécies microbianas (AKKERMANS et al., 2016; HINGSTON et al., 2017; MEJLHOLM; BØKNÆS; DALGAARD, 2015; MOCALI et al., 2017; QUINTO; MARÍN; SCHAFFNER, 2016).

### **2.5.1 Modelagem preditiva**

Modelos em microbiologia preditiva podem ser usados para avaliar o potencial de crescimento de microrganismos em alimentos, com o objetivo de prever quando, e sob quais condições, o número de microrganismos pode crescer a um nível que possa ameaçar a saúde humana e/ou comprometer a vida útil de alimentos (ROSS; MCMEEKIN; BARANYI, 2000).

Os modelos preditivos são classificados conforme o comportamento microbiano que descrevem. Assim, existem modelos de crescimento, de inativação e de limites de crescimento (MCMEEKIN; ROSS, 2002; WHITING, 1995). Dependendo de seus objetivos específicos, os modelos podem ser classificados em modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários: descrevem a resposta do microrganismo em relação ao tempo, para um conjunto de condições fixas, os modelos secundários descrevem a sensibilidade dos parâmetros do modelo primário em relação às mudanças nas condições de cultivo (por exemplo, a temperatura) e os modelos terciários sincronizam os modelos primários e secundários, com o objetivo de gerar previsões para condições ambientais variáveis e estão comumente disponíveis na forma de softwares (WHITING e BUCHANAN, 1993).

Nos últimos anos, a modelagem preditiva microbiana confirmou a sua posição como uma das ferramentas mais promissoras para apoiar decisões de segurança alimentar, principalmente devido ao sucesso da validação de modelos e desenvolvimento de *softwares* nesta área

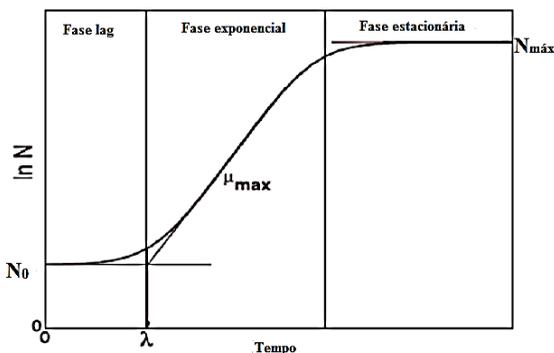
(KOUTSOUMANIS; LIANOU; GOUGOULI, 2016; MEJLHOLM; DALGAARD, 2015).

Vários estudos têm relatado a utilização da modelagem preditiva para prever o crescimento de BAL em matriz alimentar como presunto fatiado embalados a vácuo sob condições não isotérmicas (SILVA et al., 2016), estimar a dependência dos parâmetros de crescimento de BAL com a temperatura (LONGHI et al., 2016), modelar o crescimento e produção de bacteriocina por *L. mesenteroides* (DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006), entres outros.

### 2.5.1.1 Modelos primários de crescimento

Comumente, o crescimento microbiano pode ser descrito por uma curva sigmoideal (Figura 2.1) com três fases: uma fase de latência, onde as células microbianas adaptam-se ao novo ambiente, seguido por uma fase em que as células se multiplicam de forma exponencial e, finalmente, uma fase estacionária durante a qual a população máxima é atingida (LEBERT; LEBERT, 2006).

Figura 2.3 - Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo. Parâmetros de crescimento.  $\lambda$  (fase lag),  $\mu_{\max}$  (velocidade específica máxima de crescimento),  $N_0$  (concentração celular inicial) e  $N_{\max}$  (concentração celular máxima).



Fonte: Adaptado de: (SWINNEN et al. 2004).

Os modelos matemáticos de crescimento microbiano têm sua construção baseada em um bloco elementar que descreve a evolução da população através de uma equação diferencial de primeira ordem (SWINNEN et al., 2004), descrita na Equação 2.1:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t, N, \text{cond})N(t) \quad (2.1)$$

Em que  $N(t)$  é a contagem da população no instante  $t$  e  $\mu(t)$  é a velocidade específica de crescimento da população, que depende do conjunto de condições ambientais a que a população é submetida, além de fatores intrínsecos à própria população (LONGHI, 2012).

### Modelo de Baranyi e Roberts (BAR)

O modelo de Baranyi e Roberts (1994) é um dos modelos primários de crescimento mais utilizados na microbiologia preditiva (SMITH-SIMPSON et al., 2007; VAN IMPE et al., 2005). Entre as razões existentes para o uso deste modelo tem-se a sua boa capacidade de ajuste e que os parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis. Este modelo introduz um conceito de estado fisiológico das células definido pelo parâmetro  $h_0$  (BARANYI, J., ROBERTS, 1994; FERRER et al., 2009). O parâmetro  $h_0$  é definido como o produto da fase lag ( $\lambda$ ) com a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ). 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 (AUGUSTIN; ROSSO; CARLIER, 2000; FERNANDO et al., 2002; LONGHI, 2012; SWINNEN et al., 2004).

A Equação 2.2 descreve o modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI, J., ROBERTS, 1994) e na Equação 2.3 está representada a função de ajuste deste modelo.

$$\ln(N) = \ln(N_0 + \mu F(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu F(t)-1}}{e^{m(\ln(N_{m\acute{a}x}/N_0))}} \right)) \quad (2.2)$$

$$F(t) = t \frac{1}{\mu} \ln(e^{(-\mu t)} + e^{(-h_0)} - e^{[(-\mu t)-h_0]}) \quad (2.3)$$

Em que  $N$  é a concentração celular no tempo  $t$ ,  $N_0$  é a concentração celular inicial,  $N_{m\acute{a}x}$  ( $y_{m\acute{a}x}$ ) é concentração celular máxima,  $m$  é o parâmetro de curvatura do modelo e o parâmetro  $h_0$  é considerado o estado fisiológico das células que é dado pela Equação 2.4:

$$h_0 = \mu\lambda \quad (2.4)$$

De acordo com Baranyi et al. (1995), o valor do parâmetro  $h_0$  depende apenas do estado fisiológico inicial da célula, dessa forma este valor deve ser o mesmo para todas as temperaturas.

### Modelo de Gompertz (GO)

O modelo de Gompertz modificado é um modelo primário que vem sendo amplamente aplicado para descrever o crescimento de BAL (CHOWDHURY; CHAKRABORTY; CHAUDHURI, 2007; DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006). Descrito por Zwietering et al. (1990). Equação 2.5:

$$\ln(N) = \ln(N_0 + \mu F(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu F(t)-1}}{e^{m(\ln(N_{m\acute{a}x}/N_0))}} \right)) \quad (2.5)$$

Em que  $y(t)$  é a razão logarítmica entre a contagem microbiana no tempo  $t$  e a contagem inicial,  $\mu_{m\acute{a}x}$ , é a velocidade específica máxima de crescimento;  $\lambda$  é a duração da fase lag; e  $A$  é a amplitude da curva sigmoidal.

Modelos do tipo sigmoidal, como Gompertz modificado e modelos logísticos são frequentemente utilizados para ajustes aos dados de crescimento microbiano. O modelo de Baranyi e Roberts (1994) é amplamente utilizado entre os investigadores e vários estudos relataram que o mesmo apresenta melhor desempenho que o modelo de Gompertz modificado e modelos logísticos (JUNEJA et al., 2007).

#### 2.5.1.2 Modelos secundários

Os modelos secundários descrevem a influência de fatores como, temperatura, pH e  $a_w$  sobre os parâmetros dos modelos primários (HUANG; HWANG; PHILLIPS, 2011; MARKS, 2008; MCMEEKIN; ROSS, 2002; NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000). Qualquer equação que apresente uma boa descrição dos parâmetros do modelo primário com a temperatura pode ser usada como modelo secundário (LONGHI, 2012).

O modelo da raiz quadrada proposto por Ratkowsky et al. (1983) é um dos modelos secundários mais populares (BARANYI et al., 1995; GOSPAVIC et al., 2008; LEE et al., 2007; XANTHIAKOS et al., 2006). Este modelo descreve uma relação linear entre a raiz quadrada do parâmetro e a temperatura, conforme apresentado na Equação 2.6:

$$\sqrt{p} = b[T - T_{min}] \quad (2.6)$$

Em que  $p$  é o parâmetro de interesse ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ,  $\lambda$  por exemplo);  $b$  é parâmetro de inclinação empírico e  $T_{min}$  é a temperatura mínima onde se observa crescimento.

Para Corradini et al. (2006), mais importante do que usar um modelo tradicional é encontrar uma equação, ainda que empírica, que represente a influência do fator ambiental sobre os parâmetros de crescimento microbiológico.

### 2.5.1.3 Modelos dinâmicos – Modelos não isotérmicos

A maioria dos modelos são desenvolvidos e validados sob condições de temperatura constante. No entanto, as oscilações de temperatura podem ser frequentes durante o armazenamento e distribuição de alimentos. Assim, o uso de modelos não isotérmicos, para prever o comportamento microbiano em temperaturas variáveis é de grande importância, podendo ser uma alternativa para compreender as alterações ocorridas durante a cadeia de frios dos alimentos refrigerados, como os produtos cárneos (CAMARGO, 2015; NYCHAS et al., 2008).

Para a modelagem do crescimento microbiano em condições ambientais variáveis, os modelos são utilizados como equações diferenciais de primeira ordem, dos quais os parâmetros destas equações tornam-se funções das variações ambientais, dadas por modelos secundários adequados (LONGHI, 2012).

Com base nos modelos primários e secundários obtidos, pode-se constituir um modelo não isotérmico. Dentre os vários modelos utilizados para a predição do crescimento microbiano, tem-se o modelo não isotérmico de Baranyi e Roberts (1994) na forma diferencial, conforme as equações (2.7) e (2.8), com as condições iniciais descritas nas equações (2.9), (2.10) e (2.11).

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left[ \frac{1}{1+e^{-Q(t)}} \right] [1 - e^{(y(t)-y_{m\acute{a}x})}] \quad (2.7)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \quad (2.8)$$

$$Q(0) = Q_0 \quad (2.9)$$

$$y(0) = y_0 \quad (2.10)$$

$$Q_0 = \ln(e^{(h_0)^{-1}}) \quad (2.11)$$

Em que  $y(t)$  é o logaritmo natural da contagem microbiana no tempo  $t$ , ou seja,  $y(t) = \ln(N(t))$ ;  $Q(t)$  é a função do estado fisiológico das células ( $Q(t) = \ln(q(t))$ ); e os parâmetros  $\mu_{\text{máx}}$  e  $y_{\text{máx}}$  são funções da temperatura, descritos pelo modelo secundário;  $y_0$  é o valor do logaritmo natural da contagem bacteriana inicial, ou seja,  $y(0) = \ln[N_0]$ , e  $Q_0$  é o valor do estado fisiológico inicial das células, sendo que  $Q_0$  se relaciona com o parâmetro  $h_0$ , como descrito pela Equação 3.5.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMOS E CULTIVO DO PRÉ-INÓCULO

As cepas utilizadas neste estudo foram *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (ATCC® 8293™) e *Weissella viridescens* (ATCC® 12706™) adquiridas na forma de culturas puras, liofilizadas da coleção de Culturas André Tosello (Fundação Tropical de Culturas André Tosello, Campinas, Brasil) e reidratadas em caldo baseado nas formulações de De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) pH 6,5 (DE MAN et al., 1960) (Difco™, Detroit, USA), em seguida foram armazenadas em microtubos de polipropileno livres de DNases/RNases (Kasvi, Curitiba, Brasil) com caldo MRS contendo 20% (v/v) de glicerol a - 24 °C, até sua utilização. Para a preparação do pré-inóculo, as BAI em cultura pura foram reativadas a 30°C em estufa (BOD) durante 18h, até a fase estacionária de cultivo. Posteriormente, foram coletados, assepticamente em câmara de fluxo laminar, 2 mL do caldo para leituras da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro de comprimento de onda a 600 nm, atingindo uma concentração bacteriana de aproximadamente 0,9 de uma diluição 1:10 ( $\approx 10^9$  UFC/mL). As concentrações bacterianas foram estabelecidas previamente no laboratório (DALCANTON, 2010).

##### 3.1.1 Condições de cultivo em temperatura isotérmica

###### Cultura pura

A partir do pré-inóculo de *L. mesenteroides* na fase estacionária de crescimento foi retirada uma alíquota de 1 mL e realizadas diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL de caldo MRS (0,1%), até atingir a

concentração de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL. Os experimentos foram realizados em dois frascos *erlenmeyers* contendo 320 mL de caldo MRS com 1 % (v/v) de inóculo com concentração de  $10^5$  UFC/mL, correspondendo a aproximadamente  $10^3$  UFC/mL como concentração inicial para cada condição estudada. Tal concentração foi utilizada a fim de simular as concentrações bacterianas iniciais presentes em produtos cárneos. Os cultivos foram realizados em cinco temperaturas de incubação diferentes: 4, 8, 14, 20 e 30 °C e as curvas de crescimento foram acompanhadas até a fase estacionária. Os dados dos cultivo de *Weissella viridescens* em cultura pura foram obtidos, anteriormente, pelo grupo de pesquisa em microbiologia preditiva do laboratório de Engenharia Biotecnológica (Engebio) da UFSC. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

### Cultura mista

Os experimentos em cultura mista foram realizados em frascos *erlenmeyer* contendo 320 mL de caldo MRS e 1% do pré-inóculo (v/v) associados na proporção 1:1 de *L. mesenteroides* e *W. viridescens*. As curvas de crescimento foram avaliadas na temperatura de 30 °C e conduzida até a fase estacionária de crescimento e realizadas em duplicata.

### **3.1.2 Condições de cultivo em temperatura não isotérmica**

O perfil de temperatura não isotérmico foi definido dentro da faixa de temperatura dos perfis microbiológicos isotérmicos descritos na sessão 3.1.1. O crescimento de *L. mesenteroides* foi realizado em duplicata e avaliado na seguinte condição: 8 °C durante 33,0 h, 14 °C durante 63,0 h e 8 °C durante 54,0 h. As variações de temperatura foram selecionadas com a finalidade de simular falhas no processamento e armazenamento de alimentos em que o alimento poderia estar à temperatura de refrigeração (8 °C) e sofrer um aumento de temperatura até 14 °C (temperatura de abuso, ou seja, temperatura fora da faixa de refrigeração) e retornar à temperatura de refrigeração (8 °C). Os experimentos foram realizados em duas BOD programadas nas temperaturas estudadas e, nos intervalos predeterminados, os inóculos foram transferidos de estufa. Durante os experimentos, as temperaturas foram registradas a cada 5 min por um *datalogger* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha).

## 3.2 ELABORAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento foram elaboradas a partir de pontos experimentais coletados em intervalos pré-determinados, em que alíquotas do cultivo foram coletadas assepticamente em câmara de fluxo laminar, para determinação da concentração (UFC/mL) de cultura pura de *L. mesenteroides* e cultura mista de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* pelos métodos, contagem padrão em placa (CPP) e qPCR.

### 3.2.1 Método de contagem padrão em placas (CPP)

As quantificações por CPP foram realizadas em duplicata utilizando placas de Petri estéreis descartáveis (Kasvi, Curitiba, Brasil) com ágar MRS (Difco™, Detroit, USA) e adição de sobrecamada e meio de cultura para garantir a condição de microaerofilia que favorece o crescimento de BAL. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas segundo a ISO 15214: 1998. A contagem foi realizada em placas com colônias desenvolvidas em número de 25 a 250, sendo essa contagem expressa em UFC/mL. Cada ponto da curva foi registrado e usado para o estudo da cinética de crescimento.

### 3.2.2 Método de PCR quantitativa (qPCR)

As alíquotas retiradas em cada ponto experimental das curvas de crescimento foram armazenadas a -24 °C em microtubo estéreis livres de DNases/RNases (Kasvi, Curitiba, Brasil), para posterior utilização como descrito a seguir.

#### 3.2.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando kits de extração de DNA para bactérias, sendo que duas marcas foram testadas: kit de isolamento de DNA microbiano UltraClean™ da MOBIO Laboratories (Carlsbad, USA) e kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ da Zymo Research (USA) seguindo as instruções do fabricante e adição de um passo de aquecimento a 65°C por 10 min em banho maria nos tubos que continham a solução tampão. O kit de isolamento de DNA microbiano UltraClean™ da MOBIO Laboratories (Carlsbad, USA) foi selecionado para utilização neste estudo. A escolha do kit de extração foi realizada a

partir do rendimento do DNA (ng) e da análise de pureza (apresentados na seção 4.2).

### 3.2.2.2 Rendimento e grau de pureza do DNA

O rendimento do DNA extraído foi analisado em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ ND-1000 (Wilmington, Delaware, USA) o qual fornece o valor exato em ng/μL, bem como foi avaliado sua pureza através da razão de absorbância a 260 e 280 nm (A260/A280) (NANODROP, 2007).

### 3.2.2.3 Seleção dos iniciadores

Para a quantificação de *L. mesenteroides*, os iniciadores foram selecionados da literatura, segundo Petri et al. (2013). Para quantificação de *W. viridescens* o par de iniciadores que amplifica um fragmento do gene *RecN* foi utilizado (GÓMEZ-ROJO et al., 2015) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Iniciadores selecionados para as reações de qPCR.

Cepas	Iniciador*	Sequência (5' - 3')	Referência
<i>L. mesenteroides</i>	SCAR-LEU-F SCAR-LEU-R	GTGGTCATGGGCTTAGC GGATCAAGACTAGCCAATG	(PETRI et al., 2013)
<i>W. viridescens</i>	RecN-F RecN-R	CGCAAACACAACAAGCCTAT TGTTGAGCAAGTCCAAGC	(GÓMEZ-ROJO et al., 2015)

\*O iniciador tem o nome do gene alvo, e F e R no final do nome do iniciador indicam as orientações *Forward* e *Reverse*, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

### 3.2.2.4 Condições de ciclagem

As reações de qPCR foram executadas em equipamento termociclador Real Time Rotor-Gene Q® (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland), no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – BQA/CCB/UFSC, utilizando o kit Rotor-Gene SYBR® Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany). O sinal de fluorescência foi adquirido sobre o primeiro canal do SYBR® Green I (excitação 470 nm; detector 510 nm) com uma leitura florescente feita ao final de cada etapa de extensão.

### **Condições de ciclagem para *L. mesenteroides***

Para a quantificação de *L. mesenteroides*, as condições de ciclagem foram realizadas como descritas por Sambrook, (2012), e foram realizados testes com diferentes temperaturas de anelamento (55 e 60 °C) bem como testes com diferentes concentrações dos iniciadores SCAR-LEU-R/F. Para definir a temperatura de anelamento e as concentrações dos iniciadores, foram analisadas as curvas de dissociação a fim de verificar se havia amplificação de produtos inespecíficos e/ou formação de dímeros de iniciadores. Deste modo, as reações foram realizadas com um volume final de 20 µL contendo 10 µL de 2 × Rotor-Gene SYBR Green Master Mix, 300 nM de iniciadores SCAR-LEU-F/R, e 5 µL de DNA molde. Água livre de RNase foi adicionada para se obter um volume final de 20 µL. Todas as reações foram executadas em 4 repetições de cada, seguindo as condições de ciclagem: 5 min a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 10 s a 60°C, 30 s 72 °C, seguido por um passo de extensão final durante 5 min a 75 °C segundo.

### **Condições de ciclagem para *W. viridescens***

Os dados da amplificação de *W. viridescens* em cultura pura foram obtidos através de dados de estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica – ENGEBIO da UFSC. Para a quantificação de *W. viridescens* em cultura mista, foram utilizadas as condições de ciclagem segundo Gómez-Rojo et al. (2015). A reação foi realizada com um volume final de 25 µL, sendo: 12,5 µL de 2 × Rotor-Gene SYBR® Green Master Mix, 300 nM dos iniciadores recN-F/R, 2 µL do DNA molde e água livre de DNase/RNase foi adicionada para obter um volume final de 25 µL. Todas as reações foram executadas em duplicatas de cada sob as seguintes condições de ciclagem: 5 min a 95 °C, seguida 26 por 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 64 °C, 30 s a 72 °C e uma fase final de extensão feita por 10 min a 72 °C. Em cada reação deste estudo, foram incluídos microtubos com água livre de DNases/RNases como controle negativo.

#### **3.2.2.5 Construção das curvas padrão**

Para elaboração da curva padrão, foram realizadas diluições seriadas, a partir do DNA genômico obtido na fase estacionária, em água livre de DNases/RNases nas concentrações de 10<sup>9</sup> a 10<sup>0</sup> cópias do genoma. As curvas relacionadas com as contagens padrão em placa foram

construídas plotando os valores do Ct em função do log de UFC. Os valores de Ct foram conhecidos utilizando o DNA extraído da cultura pura na fase estacionária de crescimento. O *threshold* foi determinado usando a função *Auto-Find Threshold* do Rotor Gene Q®, que ajusta uma faixa de níveis de *threshold* para obter o melhor resultado da curva padrão.

A eficiência (E) da reação foi calculada de acordo com (VAERMAN; SAUSSOY; INGARGIOLA, 2004) (Equação 3.1):

$$E = \left[ \left( \frac{10^{-1}}{S} \right) - 1 \right] \cdot 100 \quad (3.1)$$

Em que S é a inclinação da reta.

### 3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA

#### 3.3.1 Modelos primários de crescimento

Os modelos selecionados para descrever o crescimento de *L. mesenteroides* em cultura pura foram os modelos primários de BAR (BARANYI e ROERTS, 1994) e GO (GIBSON; BRATCHELL; ROBERTS, 1987). Para descrever o comportamento individual de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista na temperatura de 30 °C, foi selecionado o modelo de BAR. As equações estão descritas na seção 2.3.1.1 da Revisão de Literatura. Os ajustes dos modelos aos dados foram realizados através do *software* MATLAB® R2012a versão 7.14 (MathWorks, Natick, USA), como descrito por Longhi et al. (2013).

#### Seleção do modelo primário

A seleção do modelo primário foi feita utilizando os índices estatísticos: coeficiente de determinação ( $R^2$ ), raiz do erro médio quadrático (RMSE), fator bias e fator de exatidão (ROSS, 1996), conforme descrito na seção 3.4.4.

#### 3.3.2 Modelos secundários

Os modelos secundários selecionados para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro de crescimento velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) do modelo primário utilizados neste estudo foram:

equação da raiz quadrada (RATKOWSKY et al., 1982), equação Exponencial, equação Linear e Tipo Arrhenius (tabela 3.2).

Tabela 3.2 Modelos secundários avaliados para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro velocidade específica máxima ( $\mu$ ) de crescimento de *L. mesenteroides*.

Modelos secundários	Equações
Raiz quadrada	$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min})$
Exponencial	$\mu = a \cdot e^{(bT)}$
Linear	$\mu = aT + b$
Tipo Arrhenius	$\ln \mu = a \left( \frac{1}{T} \right) + b$

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

### 3.3.3 Estabelecimento do modelo não isotérmico

O modelo não isotérmico foi estabelecido a partir do modelo de Baranyi e Roberts na sua forma diferencial (Equações 2.8 e 2.9), e com as condições iniciais descritas nas Equações 2.10, 2.11 e 2.12, utilizando o *software* MATLAB® R2012a versão 7.14 (MathWorks, Natick, USA), com a função ode23, como descrito por Longhi (2012). Os perfis de temperatura em que os experimentos foram submetidos foi adquirido por meio dos dados gravados em *datalogger* em intervalos de tempo pré-determinados, a cada 1, 5, 10 ou 15 min.

### 3.3.4 Análises estatísticas

Os índices estatísticos coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  aj) (SOPER et al., 1916), erro quadrático médio (RMSE), fator bias e fator exatidão foram utilizados para avaliar a capacidade preditiva dos modelos, segundo as equações (3.1), (3.2), (3.3) e (3.4).

$$R^2_{aj} = 1 - \left[ \frac{n-1}{n-x-1} \right] \left\{ \frac{[\sum_{i=1}^n (pd_i - \bar{pd})(ob_i - \bar{ob})]^2}{\sum_{i=1}^n (pd_i - \bar{pd})^2} \right\} \quad (3.1)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (ob_i - pd_i)^2}{n}} \quad (3.2)$$

$$Fator\ bias = 10^{\left[ \sum_{i=1}^n \log(pd_i / ob_i / n) \right]} \quad (3.3)$$

$$Fator\ exatidão = 10^{\left[ \sum_{i=1}^n |\log(pd_i / ob_i)| / n \right]} \quad (3.4)$$

Em que  $n$  é o número de dados experimentais,  $p$  é o número de parâmetros do modelo,  $pd_i$  e  $ob_i$  são os dados preditos e observados, respectivamente.

Para comparação dos métodos CPP e qPCR, foi realizada a análise de regressão linear usando a técnica de Passing-Bablok (Passing e Bablok, 1983) utilizando o MedCalc 17.1 (MedCalc® Software, Bélgica) com um nível de significância de  $p < 0,0001$  e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AJUSTE DOS MODELOS PRIMÁRIOS AS CURVAS DE CRESCIMENTO DE *L. mesenteroides* EM DIFERENTES CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS

Para a seleção do modelo primário de crescimento foram utilizados os valores dos índices estatísticos RMSE,  $R^2$ , fator bias e fator de exatidão, comparando o ajuste dos modelos de Baranyi e Roberts (BAR) e Gompertz (GO) aos dados experimentais. De acordo com Baranyi et al. (1995), o valor do parâmetro  $h_0$  depende apenas do estado fisiológico inicial da célula, dessa forma este valor deve ser o mesmo para todas as temperaturas, assim, foi definido um valor médio de  $h_0$  com relação as temperaturas de incubação estudadas (4 a 30 °C), sendo esse valor fixado em 0,8423 ( $\pm 0,5$ ), deste modo o modelo de BAR foi novamente ajustado ao dados experimentais com o valor de  $h_0$  fixo (BAR  $h_0$  fixo) Tabela 4.1

Conforme a análise dos índices estatísticos (RMSE,  $R^2$ , bias e exatidão), os dois modelos escolhidos neste estudo apresentaram possuíram bom ajuste aos dados de crescimento, entretanto o modelo de (BAR) com  $h_0$  fixo (Tabela 4.2) foi escolhido para estabelecer os parâmetros primários de crescimento de *L. mesenteroides* nas condições isotérmicas estudadas (4, 8, 14, 20 e 30 °C), pois apresentou valores para o fator bias que variaram de 1,0002 a 1,0102, já no modelo de GO esses valores variaram de 0,9587 a 1,2519. Valores de bias maiores que 1 significa que o valor predito foi maior que o valor observado, ou seja, tem-se uma falha segura, porém quando esses valores são menores que 1 isso significa que os valores observados são maiores que os valores preditos, gerando uma falha perigosa (MENEZES et al., 2018).

Vários autores relatam em seus estudos a escolha do modelo de BAR para prever o efeito da temperatura sobre o crescimento microbiano em diversas condições como, meio de cultivo (CAMARGO, 2015), produtos cárneos, (LEE et al., 2014; ZHAO et al., 2014), e alimentos

refrigerados embalados a vácuo (YE et al., 2013), segundo suas equações matemáticas e seus resultados de comparação estatística, comprovando que este foi o modelo mais constante entre os modelos analisados.

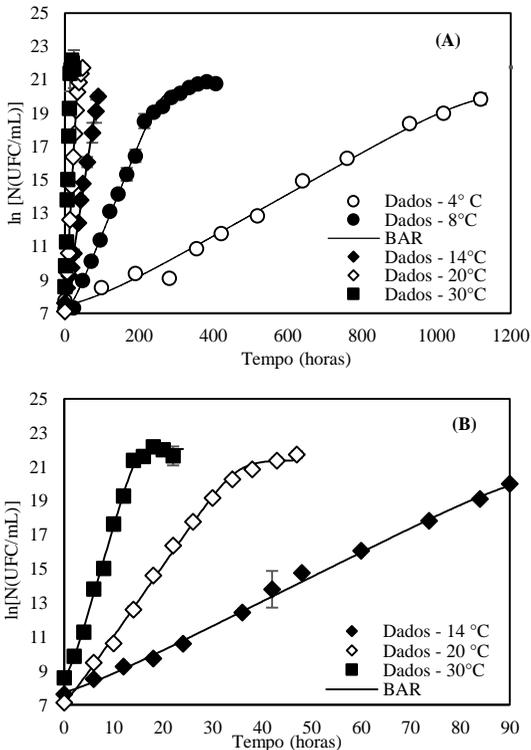
Tabela 4.1 Valores dos índices estatísticos RMSE, R<sup>2</sup>, bias e exatidão para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts com h<sub>0</sub> fixo e h<sub>0</sub> livre e o modelo de Gompertz às curvas de crescimento isotérmico de *L. mesenteroides* às temperaturas de 4, 8, 14, 20 e 30°C.

Índices	Modelos	4 °C	8 °C	14 °C	20 °C	30 °C
<b>RMSE</b>	BAR	0,3776	0,3248	0,1156	0,2821	0,4561
	BAR h <sub>0</sub> fixo	0,4464	0,3138	0,2716	0,2923	0,4341
	GO	0,1689	0,1398	0,1261	0,0983	0,2631
<b>R<sup>2</sup></b>	BAR	0,9955	0,9957	0,9965	0,9977	0,9935
	BAR h <sub>0</sub> fixo	0,9914	0,9965	0,9960	0,9973	0,9935
	GO	0,9948	0,9963	0,9965	0,9984	0,9880
<b>Exatidão</b>	BAR	1,6957	1,6842	1,2225	1,5392	1,9539
	BAR h <sub>0</sub> fixo	1,6875	1,0158	1,0158	1,0159	1,0151
	GO	1,1049	1,3772	1,0470	1,0303	1,1128
<b>Bias</b>	BAR	1,0070	1,0110	1,0012	0,9990	1,0000
	BAR h <sub>0</sub> fixo	1,0012	1,0102	1,0006	1,0010	1,0002
	GO	0,9977	1,2519	0,9798	0,9830	0,9587

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Os valores dos parâmetros primários de crescimento estão apresentados na Tabela 4.2, para uma melhor visualização pode ser observado o ajuste do modelo de BAR às curvas de crescimento isotérmico.

Figura 4.1 Ajuste do modelo de BAR aos dados experimentais das curvas de crescimento de *L. mesenteroides* nas cinco temperaturas estudadas (A), destaque das temperaturas 14, 20 e 30 °C (B) para melhor visualização.



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

De acordo com a Figura 4.1 e a Tabela 4.2, pode-se observar a importância das temperaturas de refrigeração (4 e 8 °C) no desenvolvimento de *L. mesenteroides*, temperaturas inferiores a 8°C retardam o seu crescimento.

Tabela 4.2 Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de BAR (Intervalo de confiança de 95%, em parênteses) ( $h_0 = 0,8423 \pm 0,5$ ) para *Leuconostoc mesenteroides* nas diferentes temperaturas de cultivo.

<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Parâmetros de crescimento – BAR – $h_0$ fixo			
	$\lambda$ (h)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	$y_0$ (ln UFC/mL)	$y_{m\acute{a}x}$ (ln UFC/mL)
4 °C	67,145	0,012 (0,011; 0,013)	7,452 (6,887; 8,017)	20,46 (18,44; 22,48)
8 °C	15,273	0,055 (0,052; 0,057)	7,057 (6,686; 7,428)	20,54 (20,25; 20,82)
14 °C	5,670	0,148 (0,141; 0,155)	7,930 (7,633; 8,227)	20,63 (19,28; 21,98)
20 °C	1,952	0,431 (0,407; 0,455)	7,390 (6,955; 7,840)	21,34 (20,94; 21,74)
30 °C	0,858	0,981 (0,896; 1,066)	8,540 (7,862; 9,231)	22,05 (21,64; 22,47)

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Como pode ser observado (Tabela 4.2) os parâmetros de crescimento  $\lambda$  que representa a duração da fase lag, e a velocidade máxima específica máxima ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) são estritamente influenciados pela temperatura de incubação, com a diminuição da temperatura, verifica-se o aumento da fase lag e a diminuição da velocidade específica máxima. Drosinos e colaboradores (2006), ao modelar o crescimento *L. mesenteroides* E131 sob condições isotérmicas diversas, observaram essa mesma tendência, na qual, o parâmetro  $\mu_{m\acute{a}x}$  diminuiu, proporcionalmente, com o diminuição da temperatura de incubação. O mesmo foi observado por (GARCÍA-GIMENO et al., 2005), que ao comparar o desempenho de modelos matemáticos no crescimento de *L. mesenteroides* em meio de cultivo, observaram que a fase lag diminuiu com o aumento da temperatura de incubação.

O aumento do fator temperatura ocasiona alterações em os parâmetros mostrando que a temperatura influencia diretamente no desenvolvimento desse microrganismo, deste modo o controle da cadeia de frio é de fundamental importância, visto que a temperatura de armazenamento de produtos cárneos encontra-se na faixa de 0 a 10 °C (DALCANTON, 2010).

Alguns autores também relataram essa mesma tendência dos parâmetros de crescimento de BAL que são influenciados pela variação da temperatura de crescimento (DALCANTON, 2010; DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006; GEITENES et al., 2013; CAMARGO, 2015).

Com a finalidade de descrever a influência que a temperatura exerce sob os parâmetros primários de crescimento, o ajuste desses a modelos secundários faz-se necessário.

### 4.1.1 Modelos secundários

A escolha do modelo secundário que descreve a influência da temperatura sobre o parâmetro de crescimento velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) obtido por meio do modelo primário de BAR, foi realizado pela comparação dos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) encontrados pelo ajuste de quatro modelos secundários, modelo da Raiz quadrada, exponencial, linear e tipo Arrhenius, como apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Equações dos modelos secundários que descrevem a influência da temperatura sobre o parâmetro de crescimento velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ).

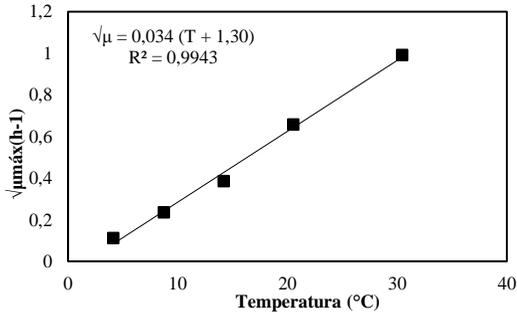
Modelo	Equação	$R^2$
Raiz quadrada	$\sqrt{\mu} = 0,034(T - 1,647)$	<b>0,9943</b>
Exponencial	$\mu = 0,0109 e^{0,1608T}$	0,9375
Linear	$\mu = 0,0375 T - 0,2598$	0,9292
Tipo Arrhenius	$\ln \mu = -19,296 (1/T) - 0,0497$	0,8950

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Como observado na Tabela 4.3, o melhor coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,9943$ ) indica que o modelo da raiz quadrada representa bem o efeito da temperatura sobre o crescimento máximo. Este comportamento é semelhante em diversas BAL, como por exemplo, Camargo (2015) ao estudar a influência da temperatura no crescimento das BAL, *Lb. plantarum*, *Lactobacillus sakei* e *W. viridescens* obteve resultados semelhantes ao escolher o modelo secundário da raiz quadrada para avaliar a influência da temperatura sobre parâmetro primário de crescimento  $\mu_{\text{máx}}$ , obtendo valores de  $R^2$  de 0,992, 0,993 e 0,993, respectivamente.

A Figura 4.2 apresenta o gráfico do ajuste, com a equação do modelo e seu respectivo valor de  $R^2$ .

Figura 4.2 Modelo secundário que descreve o efeito da temperatura no parâmetro de crescimento ( $\bullet$ )  $\mu_{\max}$ . A linha contínua representa o ajuste do modelo selecionado.



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

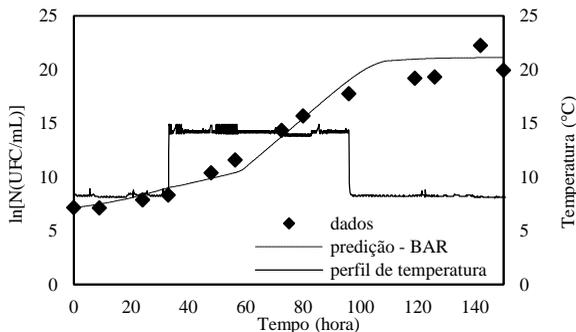
em que, os valores dos parâmetros  $b$  e  $T_{min}$  são  $0,034 \text{ h}^{-0,5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  e  $-1,30^\circ\text{C}$ .

O parâmetro  $y_{\max}$  apresentou uma variação mínima com a temperatura, sendo o seu valor considerado constante fixado em torno de uma média.

#### 4.1.2 Crescimento de *L. mesenteroides* sob condições não isotérmicas

A curva de crescimento de *L. mesenteroides* em condição não isotérmica de cultivo envolvendo temperaturas de 8 a  $14^\circ\text{C}$ , previstas pelo modelo de Baranyi e Roberts (1994) equações (eq. Sessão 3.3.3), considerando o perfil de temperatura (8-14-8  $^\circ\text{C}$ ) está exposta na Figura 4.3.

Figura 4.3 Curva de crescimento de *L. mesenteroides* sob condições não isotérmicas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Como pode ser observado na Figura 4.3, o modelo de BAR previu bem o crescimento de *L. mesenteroides* ao perfil de oscilação de temperatura com início sob refrigeração (8 °C) seguido de uma faixa de abuso de temperatura (14 °C) e novamente submetido a uma temperatura de refrigeração (8°C), com o objetivo de simular o que ocorre na cadeia de distribuição e armazenamento de alimentos refrigerados.

O modelo foi capaz de predizer bem o crescimento na fase lag, o que não ocorreu na fase estacionária de crescimento, em que há uma superestimação da predição. A capacidade de predição de modelos não isotérmicos está relacionada com a qualidade do ajuste dos modelos primário e secundário (CAMARGO, 2015). Segundo Longhi (2012), as predições são melhores quando a temperatura inicial do cultivo está próxima da temperatura ótima de crescimento, para *L. mesenteroides*, a temperatura ótima de crescimento é 30 °C, o que justifica a superestimação em alguns pontos da curva de crescimento.

Os valores de RMSE, R<sup>2</sup>, fator bias e fator exatidão da predição de crescimento de *L. mesenteroides* do perfil não isotérmicos avaliado estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 índices estatísticos do modelo não isotérmico de BAR para o perfil de temperatura (8-14-8 °C) de *Leuconostoc mesenteroides*.

Índices	Perfil de temperatura (8-14-8 °C)
RMSE	1,0030
R <sup>2</sup>	0,9800
Bias	1,0227
Exatidão	1,0602

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Os índices estatísticos avaliados na Tabela 4.4 permite observar um bom desempenho do modelo de BAR para prever o crescimento de *L. mesenteroides* na condição estudada, uma vez que os valores do RMSE, R<sup>2</sup>, fator exatidão encontram-se próximos a 1, verifica-se também que o modelo apresentou uma predição segura, com fator bias maior que 1.

Diversos estudos realizados pelo grupo de pesquisa em microbiologia preditiva do Engebio/UFSC também confirmaram uma boa predição do modelo de BAR para prever o crescimento de BAL em temperaturas não-isotérmicas (CAMARGO, 2015; DALCANTON, 2010; MARTINS, 2015; SILVA et al., 2016).

É importante ressaltar que não foram encontrados na literatura estudos avaliando o crescimento de *L. mesenteroides* sob condições dinâmicas de temperatura.

## 4.2 VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE qPCR PARA *L. mesenteroides* EM CULTURA PURA EM CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS

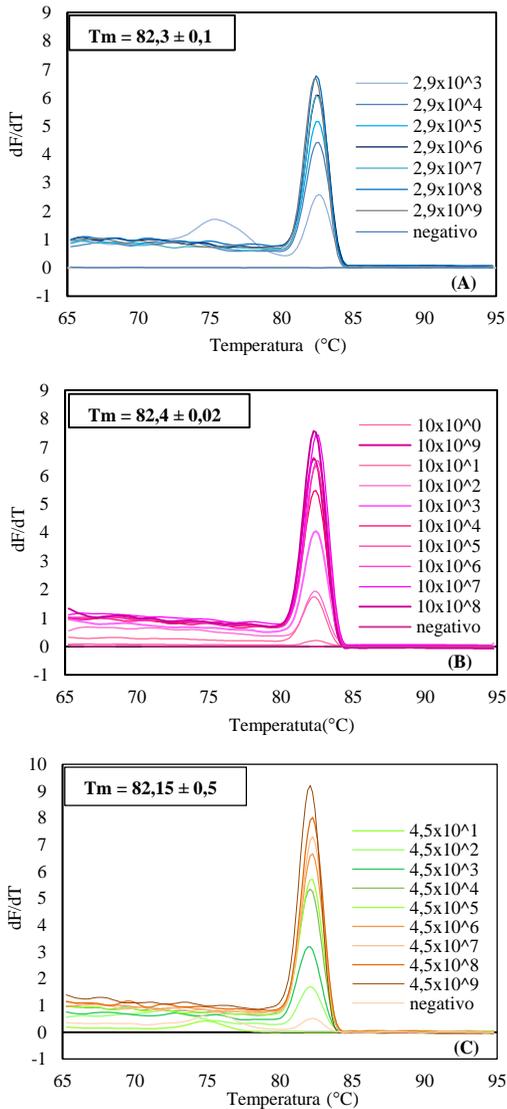
Neste estudo foram utilizados iniciadores SCAR (do inglês sequence-characterized amplified region) para quantificação de *L. mesenteroides* (PETRI et al., 2013). SCAR é um fragmento de DNA genômico em um único *locus* geneticamente definido que é identificado por amplificação por PCR, usando um par de iniciadores oligonucleotídicos específicos (PARAN; MICHELMORE, 1993).

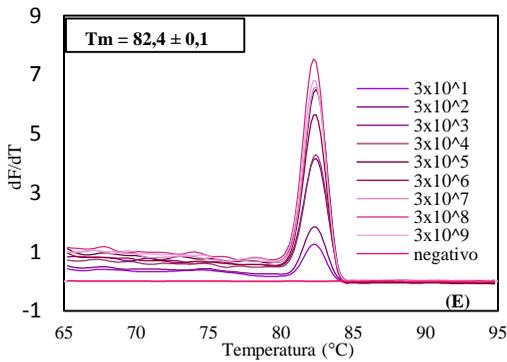
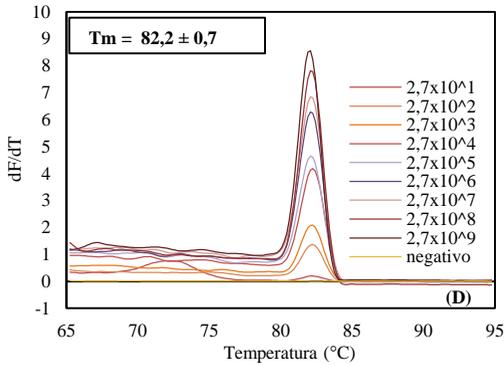
O uso de iniciadores SCAR para identificação/quantificação de BAL tem sido relatado em diversos estudos como os que foram relatados por SOLIERI; GIUDICI (2010) que utilizaram marcadores SCAR para detecção específica da cepa de *Oenococcus oeni* durante a fermentação maloláctica do vinho e CHRIST (2015) que utilizou marcadores SCAR na determinação das BAL, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* spp., *L. mesenteroides*, *W. paramesenteroides* e *Pediococcus* spp., para investigar a relação entre a diversidade microbiana e a composição química do mosto de vinho.

O par de iniciadores descritos por (PETRI et al., 2013) para quantificação de *L. mesenteroides*, mostrou-se específico (CHRIST, 2015; MIRANDA-CASTILLEJA et al., 2016). A especificidade é de grande interesse, visto que apenas se amplifica, detecta e quantifica a sequência alvo desejada (HEID et al., 1996). A especificidade da reação é confirmada através das curvas de *melting* (Figura 4.4) que indicam o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos iniciadores específicos, para as sequências alvo que se deseja amplificar e outras 7 espécies bacterianas como controle negativo (Tabela 4.5).

Para cada temperatura de cultivo (4, 8, 14, 20 e 30 °C), foi realizada a análise da curva de *melting* das diluições seriadas para obtenção das curvas padrão. Como pode ser observado na Figura 4.4, a  $T_m$  média para as Temperaturas de cultivo foi  $82,3 \pm 0,1$ ;  $82,4 \pm 0,02$ ,  $82,15 \pm 0,5$ ,  $82,2 \pm 0,7$  e  $82,4 \pm 0,1$  nas temperaturas de 4, 8, 14, 20 e 30 °C respectivamente, com a formação de um único pico, exceto para o gráfico (A) em que se observou a formação de dois picos na diluição  $2,9 \times 10^3$ , com amplificação de produto inespecífico ou formação de dímero de iniciadores. Isso pode ser justificado pelo fato da amostra estar bastante diluída apresentando uma quantidade de DNA muito baixa ( $12,9 \times 10^{-6}$  ng) (APÊNDICE A).

Figura 4.4 Curvas de melting para as diluições seriadas de DNA das curvas padrão de *Leuconostoc mesenteroides* em cultura pura, nas cinco temperaturas estudadas, 4°C (A), 8°C (B), 14°C (C), 20°C (D) e 30°C (E).





Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Tabela 4.5 Valores médios para o teste de especificidade para os pares de iniciadores SCAR utilizando DNA extraído de *L. mesenteroides* (controle positivo), outras espécies bacterianas e água *milli-Q* (controles negativos). Os valores de Ct e T<sub>m</sub> em **negrito** indicam os valores para o DNA alvo.

Cepa	Ct	T <sub>m</sub>
<i>L. mesenteroides</i>	<b>9,28 ± 0,29</b>	<b>82,25 ± 0,00</b>
<i>Lb. bulgaricus</i>	19,64 ± 0,94	85,33 ± 1,00
<i>Lb. paracasei</i>	17,06 ± 0,26	85,56 ± 0,05
<i>Lb. sakei</i>	18,82 ± 0,18	84,58 ± 0,11
<i>Pseudomonas flourescens</i>	17,74 ± 0,80	88,25 ± 0,25
<i>W. viridescens</i>	19,49 ± 0,20	84,47 ± 0,40
<i>Lb. casei</i>	20,08 ± 1,01	84,66 ± 0,19
<i>Lb. Plantarum</i>	15,99 ± 0,92	85,38 ± 0,10
Água Milli-Q	30,74 ± 0,88	71,65 ± 0,00

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

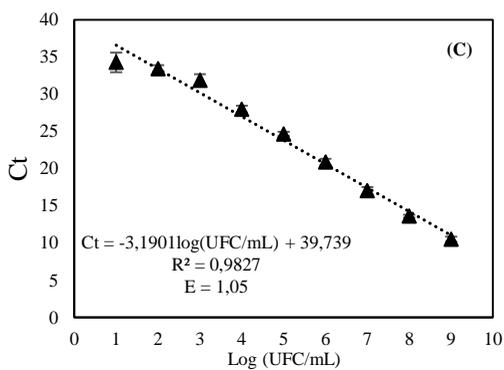
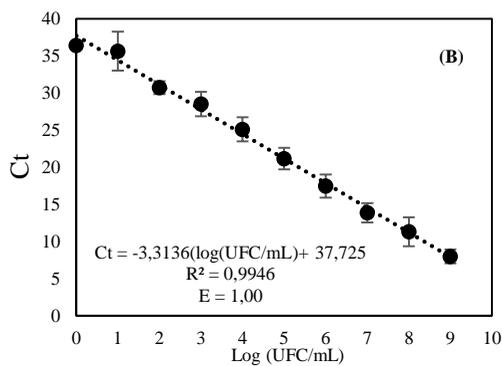
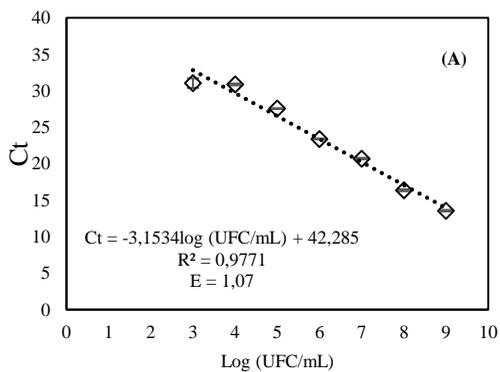
Alguns autores também utilizam valores de  $T_m$  para BAL a fim de verificar a especificidade das reações de qPCR, como para *Lb. delbrueckii* em queijo  $T_m = 80,9$  °C (ACHILLEOS e BERTHIER, 2017),  $83.69 \pm 0.03$  °C para *Lb. Casei*;  $81.66 \pm 0.06$  °C para *Lb. rhamnosus*, e  $84.16 \pm 0.04$  °C para *L. paracasei* em cultura pura (COMI et al., 2016).

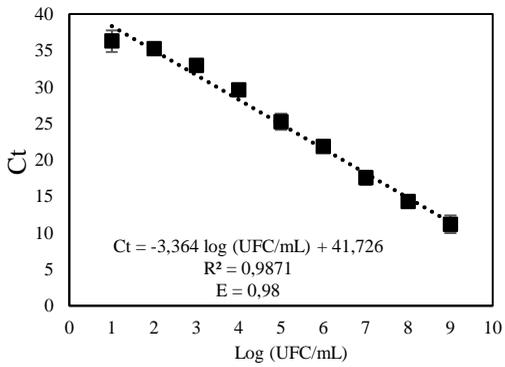
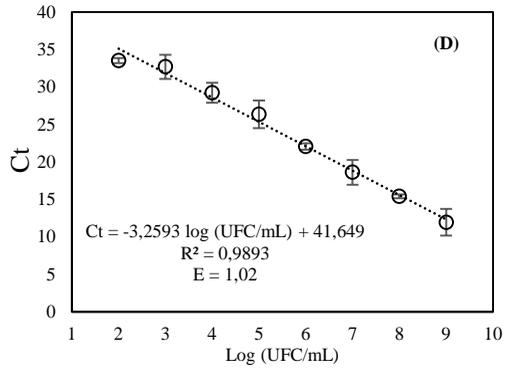
Na Tabela 4.5 verificou-se que o par de iniciadores do gene SCAR apresentou amplificação para *L. mesenteroides* com valor de  $C_t$  igual a  $9,28 \pm 0,29$  e apresentou um  $T_m$  de  $82,25 \pm 0,00$  °C. Para as demais cepas testadas os valores da  $T_m$  foram diferentes do encontrado para cepa alvo, para água *milli-Q* não houve amplificação e os valores de  $C_t \geq 30$  representando um  $C_t$  tardio.

Para construção das curvas padrão de quantificação de *L. mesenteroides*, os dados de quantificação (contagem de *L. mesenteroides* e os valores de  $C_t$ ) foram submetidos à transformação logarítmica. A variável  $C_t$  é uma forma de avaliar o quanto de DNA existe na amostra, de acordo com o número de ciclos da reação. Os valores de  $C_t$  são inversamente proporcionais à quantidade de DNA alvo da amostra. As equações padrão para quantificar *L. mesenteroides* estão dispostas na Figura 4.5. As curvas padrão foram feitas para cada temperatura de incubação analisada neste estudo a partir de diluições seriadas de concentração conhecida, baseadas nos valores de  $C_t$  de cada amostra e o log de UFC/mL (Figura 4.5), todos os ensaios foram realizados em quadruplicata. As eficiências (E) foram calculadas para cada reação com base no declive das curvas padrão (equação 3.1).

De acordo com a Figura 4.5, as inclinações (*slope*) das curvas padrão, calculadas utilizando DNA genômico foram -3,15, -3,31, - 3,19, -3,25 e -3,36 para as temperaturas de cultivo de 4, 8, 14, 20 e 30 °C, respectivamente, estes valores estão próximos ao ótimo teórico de -3,32 proposto por Higuchi et al, (1993). Os valores de  $R^2$  acima de 0,97, obtidos nas curvas indicam que o ensaio de qPCR foi altamente linear e com valores de Eficiência (E) de 1,07, 1,00,1,05, 1,02 e 0,98 para as curvas (A), (B), (C), (D) e (E), respectivamente, mostrando que as curvas padrão obtidas no presente trabalho são consideradas confiáveis, Uma curva padrão confiável deve apresentar uma eficiência entre 90 a 110% (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

Figura 4.5 Curvas padrão das diluições seriadas de DNA de *Leuconostoc mesenteroides* em cultura pura nas cinco temperaturas estudadas, 4°C (A), 8°C (B), 14°C (C), 20°C (D) e 30°C (E).





Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

O limite de detecção (LOD) é descrito como a menor quantidade de analito (DNA) medida em uma amostra que pode ser detectada (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2004; FOROOTAN et al., 2017). Os valores de LOD para as curvas de crescimento das temperaturas de cultivo (Tabela 4.5) corresponderam a  $2,9 \times 10^3$ , 10,  $4,5 \times 10^1$ ,  $2,7 \times 10^2$  e  $3,0 \times 10^1$  UFC/mL, com valores de Ct  $31,05 \pm 0,2$ ,  $33,31 \pm 0,4$ ,  $31,22 \pm 0,2$ ,  $30,45 \pm 0,1$  e  $35,40 \pm 0,4$ , respectivamente (Tabela 4.5). Na detecção de BAL, valores semelhantes foram reportados por Elizaquível et al., (2008) que encontrou LOD de  $1,8 \times 10^4$  UFC/mL para *L. mesenteroides* inoculado artificialmente em produtos cárneos, SELIM et al. (2005) para *Lb. thermotolerans* em cultura pura encontrou valor de LOD de  $10^3$  UFC/mL, para *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* o limite de detecção de  $10^2$  UFC/ mL foi relatado por (GRATTEPANACHE et al., 2005).

Tabela 4.6 Valores de LOD encontrados para cada T estudada.

Temperatura (° C)	Concentração (UFC/mL)	Ct
4	$2,9 \times 10^3$	$31,05 \pm 0,2$
8	10	$33,31 \pm 0,4$
14	$4,5 \times 10^1$	$31,22 \pm 0,2$
20	$2,7 \times 10^2$	$30,45 \pm 0,1$
30	$3,0 \times 10^1$	$35,40 \pm 0,4$

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

#### 4.2.1 Quantificação de *L. mesenteroides* por CPP e qPCR

Em intervalos pré-determinados de acordo com a temperatura de incubação de cada cultivo de *L. mesenteroides* em cultura pura, foram retiradas alíquotas para elaboração das curvas de crescimento por CPP e por qPCR. O DNA foi extraído de cada ponto experimental da curva de crescimento e quantificado em espectrofotometro Nanodrop.

##### 4.2.1.1 Rendimento e pureza do DNA

A amplificação por qPCR pode falhar devido à presença de inibidores da reação, quantidade insuficiente desde ou mesmo devido à combinação destes fatores, se a amostra já se encontra muito degradada e, se a quantidade de DNA presente for mínima, prejudicará o êxito do ensaio (OLIVEIRA, 2009). Desta forma, faz-se necessária a análise do rendimento e pureza do DNA extraído (ANEXO B).

O rendimento e qualidade do DNA extraído da cultura pura de *L. mesenteroides* foram analisados em Espectrofotômetro Nanodrop (NANODROP, 2007). A pureza do DNA foi avaliada através da razão de

absorbância  $A_{260}/A_{280}$ . O desvio do valor teórico de aproximadamente 1,8 para os extratos de DNA indica a presença de proteína, fenóis ou contaminantes, que absorvem fortemente na região de 280 nm (OLIVEIRA et al., 2013).

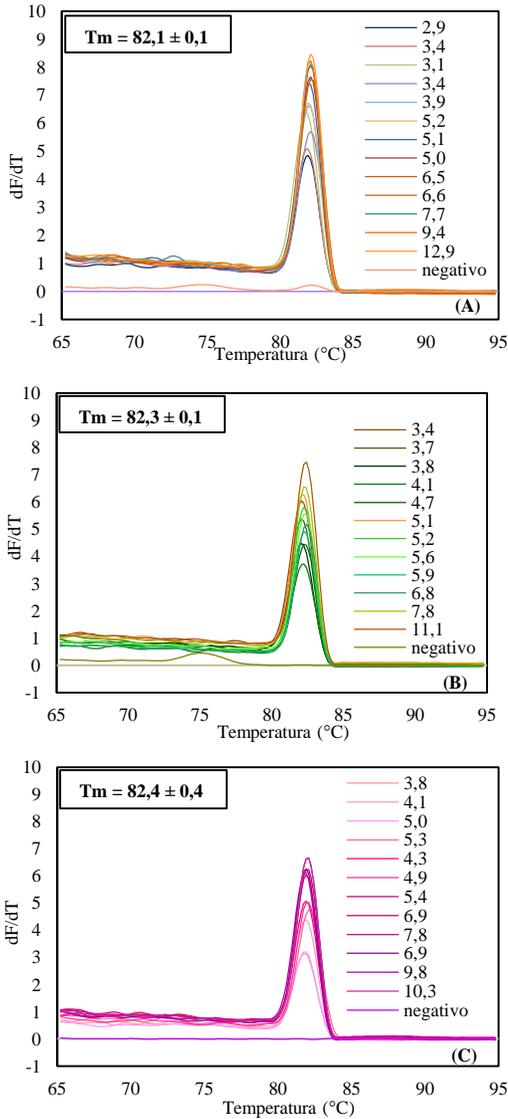
A qualidade do DNA de *L. mesenteroides* foi analisada a partir da média de duas extrações do DNA das curvas de crescimento de cada temperatura de cultivo, obtida através da relação  $A_{260}/A_{280}$ . Com base nos dados das tabelas 4.6 e 4.7 o DNA extraído nas curvas de crescimento obtiveram um bom rendimento, assim como demonstraram uma boa qualidade.

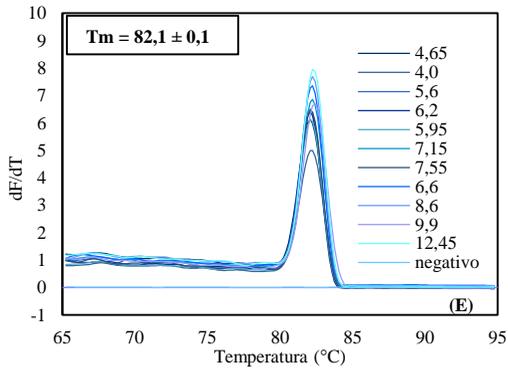
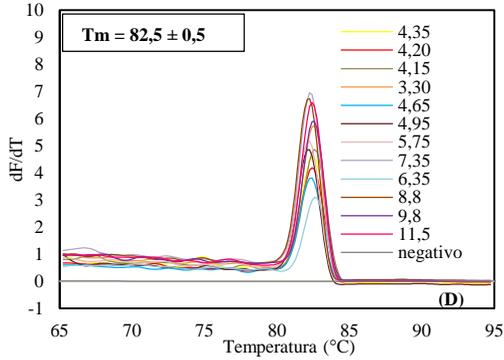
#### 4.2.1.2 Especificidade das reações de qPCR

Entende-se por especificidade, a capacidade de amplificar e analisar inequivocamente o DNA da espécie que se pretende analisar. A especificidade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, a substância em análise, mesmo na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação, numa amostra complexa (OLIVEIRA, 2009). A especificidade das reações para elaboração das curvas de crescimento foi obtida pela análise da temperatura de *melting*.

Pode ser observado na Figura 4.6 que houve a formação de um único pico em todos os gráficos que representam cada curva de crescimento nas temperaturas isotérmicas analisadas de *L. mesenteroides* em cultura pura, mostrando que o par de iniciadores utilizados amplificou um único lugar no genoma, e os valores  $T_m$  obtidos confirmam a especificidade das reações de qPCR para elaboração das curvas de crescimento. Tais valores são análogos aos encontrados na validação dos ensaios (Figura 4.4).

Figura 4.6 Curvas de melting para as curvas de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em cultura pura nas cinco temperaturas estudadas, 4°C (A), 8°C (B), 14°C (C), 20°C (D) e 30°C (E), quantidade de DNA (ng) de cada ponto experimental e Tm média para cada curva de crescimento.





Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

#### 4.2.1.3 Elaboração das curvas de crescimento por qPCR

As curvas de crescimento obtidas pelo método qPCR que foram comparadas às curvas de crescimento obtidas por CPP estão dispostas na Figura 4.10. Para elaboração das curvas de crescimento por CPP, os valores obtidos foram reportados em log UFC/mL, para obtenção destes por qPCR foram calculados por interpolação a partir das curvas padrão com os valores de Ct, gerados a partir das curvas de crescimento de cada temperatura de incubação (ANEXO C).

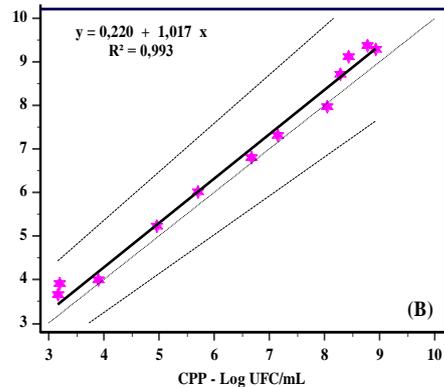
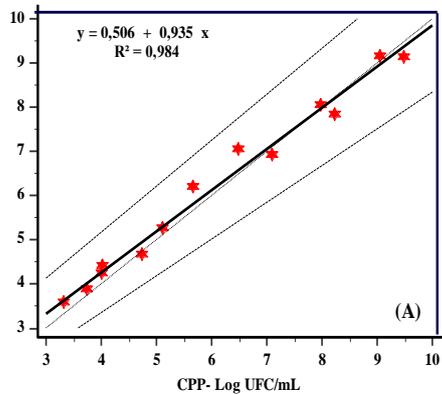
Os valores médios de Ct para cada condição de crescimento de *L. mesenteroides* variaram de 13,48 a 30,95 para T de 4 °C; 6,92 a 31,6 na T de 8 °C; 10,34 a 29,06 para T 14 °C; 13,38 a 30,95 na T de 20 °C e 11,33 a 30,62 na T de 30 °C. A partir destes valores, foram encontrados os valores em Log de UFC/mL de *L. mesenteroides* por qPCR (ANEXO C). Os valores de UFC/mL por CPP e qPCR foram considerados similares porém, em alguns pontos da curva, há uma diferença maior nesses valores, diferença que pode ter sido causada pelo uso da técnica de qPCR que quantifica células não viáveis. A partir disto, uma análise comparativa entre os métodos foi realizada.

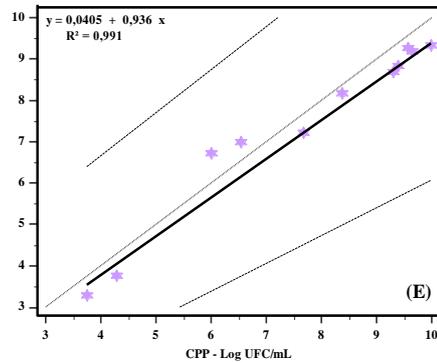
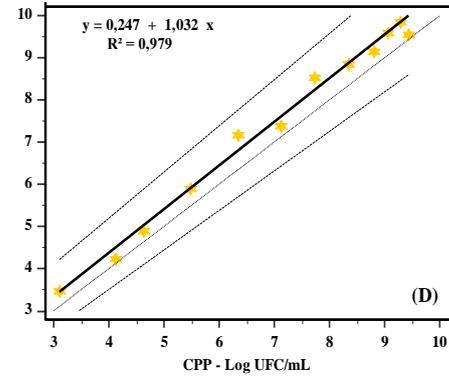
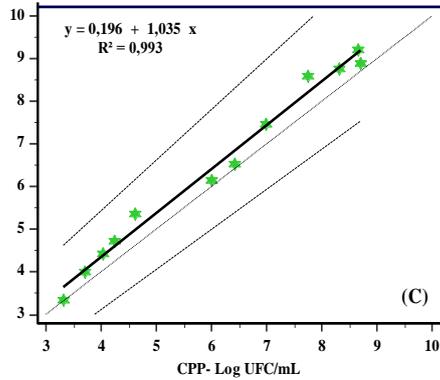
#### 4.2.1.4 Comparação entre os métodos de CPP e qPCR

Para comparação entre os métodos CPP e qPCR, aplicou-se o teste de Correlação de Pearson por meio da regressão linear (IC 95%) (Figura 4.7) e foi avaliada também a concordância destes através dos gráficos de Bland-Altman (Figura 4.8).

Com valores de R<sup>2</sup> de 0,984, 0,993, 0,993, 0,979 e 0,991 para cada curva de crescimento nas temperaturas de incubação de 4, 8, 14, 20 e 30 °C respectivamente, em que os dados possuem uma dispersão constante ao longo da linha de identidade (linha contínua) Figura 4.8, reportando que a análise de regressão linear demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre os métodos de CPP e qPCR para quantificação de *L. mesenteroides* nas temperaturas isotérmicas de cultivo. Um bom ajuste na regressão linear é, regularmente, empregado para comparar dois métodos, mas a linearidade não resulta obrigatoriamente, numa boa concordância (BLAND e ALTMAN, 1986; BUNCE, 2009 e CLAIS et al., 2014). Deste modo, a análise de Bland-Altman foi utilizada para avaliar o nível de concordância entre os dois métodos (Figura 4.9).

Figura 4.7 Diagramas de regressão linear dos valores log UFC/mL obtidos pelo método CP e qPCR para quantificação de *Leuconostoc mesenteroides*: 4 °C (A), 8 °C (B), 14 °C (C), 20 °C (D) e 30 °C (E).



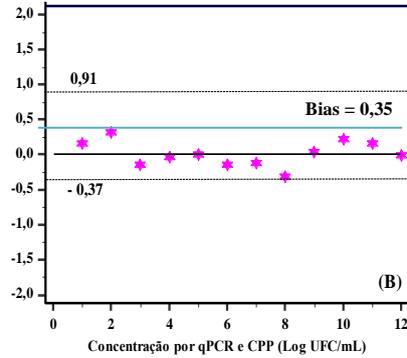
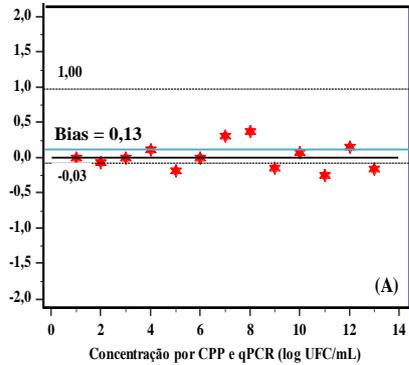


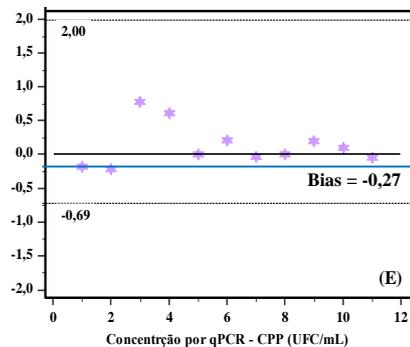
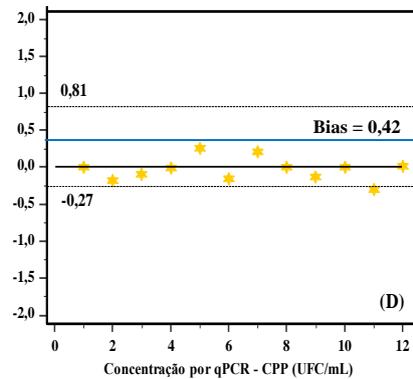
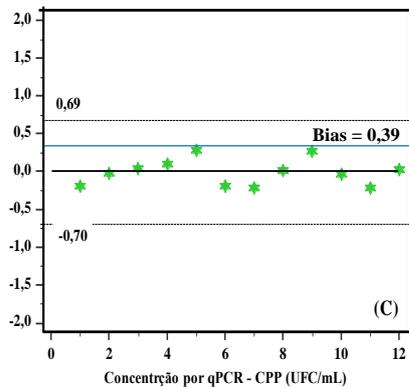
Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Ao analisar a Figura 4.8, observa-se que a maioria dos pontos encontram-se dentro dos limites do intervalo de confiança de 95%, esses limites foram de -0,03 a 2,00 (A); -0,37 a 0,91 (B); -0,70 a 0,69 (C); -0,27 a 0,81 (D) e -0,69 a 2,00 (E), valores estes próximos à reta de igualdade (diferença = 0), com valores de Bias de 0,13; 0,35; 0,39; 0,42 e -0,27, respectivamente. O Bias é a diferença média entre s valores de UFC/mL por ambos os métodos. Nenhuma tendência foi observada ao comparar CPP e qPCR, deste modo o método de qPCR pode ser utilizado para quantificar *L. mesenteroides* em cultura pura sob condições de crescimento diversas, apesar de ser um método que não é capaz de distinguir células viáveis de células não viáveis.

Alguns autores verificaram a concordância entre métodos convencionais e métodos moleculares através da análise dos gráficos de Bland-Altman. Para quantificação de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino (CARVALHO, 2013), *Staphylococcus aureus* em amostras de leite (DIBBERN, 2014) e *Campylobacter jejuni* em amostras de aves (PAPIĆ et al., 2017). Mostrando que essa análise é válida para avaliar a concordância entre os métodos avaliados no presente trabalho.

Figura 4.8 Concordância entre os métodos CP e qPCR através da análise de Bland-Altman para quantificação de *Leuconostoc mesenteroides*: 4 °C (A), 8 °C (B), 14 °C (C), 20 °C (D) e 30 °C (E).





Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

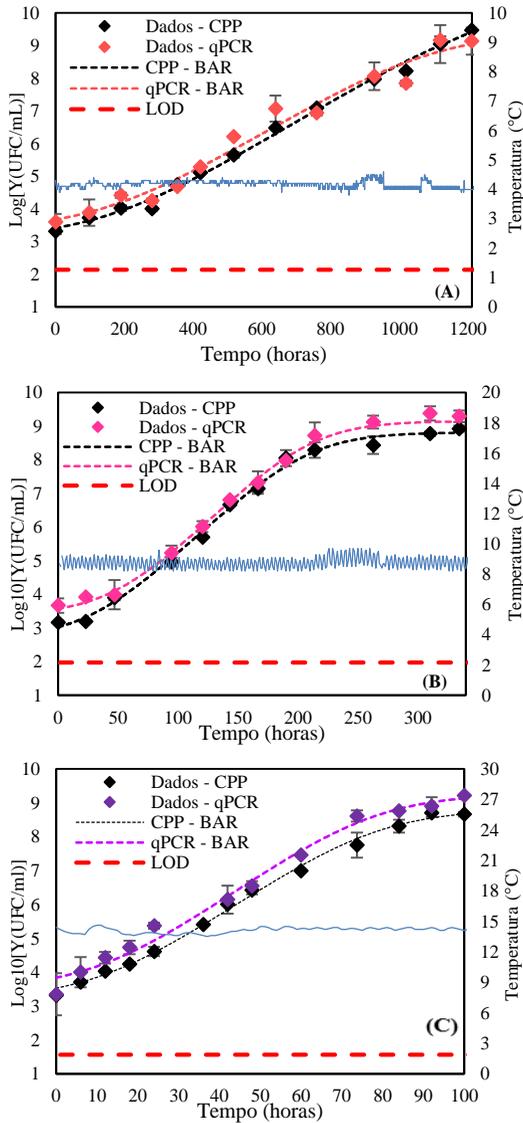
#### 4.2.1.5 Ajuste das curvas de crescimento de *L. mesenteroides* pelos métodos de CPP e qPCR

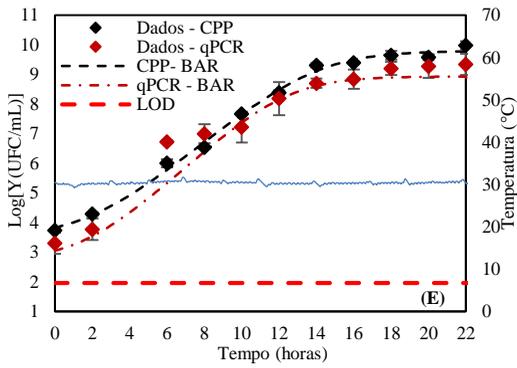
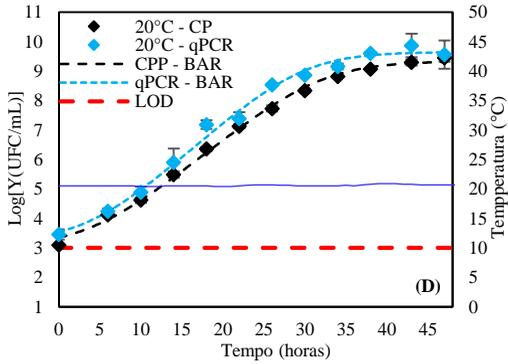
As curvas de crescimento foram construídas a partir dos valores de log UFC/mL obtidos em cultura pura de *L. mesenteroides* nas temperaturas de 4 °C (A), 8 °C (B), 14 °C (C), 20 °C (D) e 30 °C (E) (Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10). O modelo de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados experimentais de crescimento. Todas as curvas de crescimento apresentaram formato sigmoidal contendo as fases lag, exponencial e estacionária (Figura 4.9).

Ao analisar a Figura 4.9, pode-se visualizar que, na maioria das curvas para ensaio de qPCR, a cepa *L. mesenteroides* teve um crescimento maior quando comparado ao método de CPP. Uma hipótese para explicar essa diferença seria o fato do corante SYBR Green amplificar toda dupla hélice de DNA contida na reação, ou seja, amplificando também células não viáveis. Para ajudar a reduzir este problema, corantes alternativos vem sendo amplamente utilizados, como monoazida de etídio (EMA) e monoazida de propídio (PMA), que são corantes intercalantes de DNA que podem entrar seletivamente em células com membrana danificada (consideradas inviáveis) e se ligar covalentemente ao seu DNA, quando exposto à luz halógena, inibindo sua amplificação durante a qPCR (MENDONÇA, 2016). Estudos recentes relatam a utilização desses corantes combinados com qPCR na quantificação microbiana. Scariot et al., (2018) utilizaram o corante PMA combinado com qPCR para quantificação de células viáveis de *Lb. paracasei* em iogurte probiótico, Cattani, (2012) também utilizou essa metodologia para detecção e quantificação de células viáveis de *Bacillus sporothermoduram* e *Bacillus cereus* em leite e Mendonça, (2016) utilizou a técnica de qPCR combinada com o corante EMA na quantificação de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em queijos coalho e quantificação de *Salmonella enterica* utilizando o corante EMA combinado com qPCR (WU; CHEN; LEVIN, 2015).

Os valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo de BAR para os métodos de CPP e qPCR estão dispostos na tabela 4.6.

Figura 4.9 Curvas de crescimento e ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (1994) aos dados: 4 °C (A), 8 °C (B), 14 °C (C), 20 °C (D) e 30 °C (E).





Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Tabela 4.7 Parâmetros do ajuste do modelo de BAR aos dados de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* pelos métodos de CPP e qPCR.

<i>Leuconostoc mesenteroides</i>						
Parâmetros						
De crescimento	Método	4 °C	8 °C	14 °C	20 °C	30 °C
$\lambda$ (h)	CPP	192,39	36,20	14,69	5,38	2,39
	qPCR	192,28	39,20	14,31	4,94	1,98
$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	CPP	0,01	0,034	0,08	0,23	0,52
	qPCR	0,01	0,031	0,09	0,25	0,62
$y_0$ (log UFC/mL)	CPP	3,42	3,03	3,53	3,35	3,83
	qPCR	3,68	3,52	3,84	3,54	2,94
$y_{\text{máx}}$ (log UFC/mL)	CPP	10,24	8,82	8,81	9,34	9,79
	qPCR	9,43	9,42	9,26	9,64	8,62

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Como já mencionado anteriormente, o parâmetro  $h_0$  do modelo de BAR foi fixado e o modelo foi reajustado aos dados experimentais com o valor do  $h_0$  fixo de  $1,231 \pm 0,2$ , para ambos os métodos o valor foi o mesmo (ANEXO D), tendo em vista que a variação deste parâmetro para cada método foi mínima. Os Parâmetros de crescimento para qPCR e CPP estão expressos na Tabela 4.6, observa-se que os valores dos mesmos foram similares em relação a cada um dos dois métodos avaliados.

Ao se comparar os dois métodos, foi observado que o parâmetro  $\lambda$  não sofreu grandes variações, a maior delas ocorreu a 8 °C com valores de  $\lambda$  36,2 e 39,2 para CPP e qPCR, respectivamente. Esse parâmetro está especificamente relacionado com a temperatura de incubação da BAL em estudo, em que a variação do mesmo com relação a temperatura foi de 192,39 e 192,28 na T de 4 °C a 2,39 e 1,98 na T de 30 °C para CPP e qPCR, respectivamente, isso mostra que a duração da fase lag é inversamente proporcional à temperatura, ou seja, com o aumento da temperatura ocorre a diminuição dos valores de  $\lambda$ .

Com relação ao parâmetro  $\mu_{\text{máx}}$ , a variação dos valores para cada um dos métodos foi ainda menor, este parâmetro também está estritamente relacionado com a temperatura a que o microrganismo foi submetido, como pode ser observado na Tabela 4.6. À medida que a temperatura de incubação aumentou, houve uma aumento proporcional nos valores deste parâmetro, esta variação foi de 0,1 para os métodos de qPCR e CPP na T de 4 °C a 0,52 e 0,62 para a T de 30 °C pelos métodos de CPP e qPCR, respectivamente.

O parâmetro população máxima atingida ( $y_{\text{máx}}$ ) foi o que teve maior distinção de valores ao comparar os métodos de CPP e qPCR. Na maioria das temperaturas de incubação, o ensaio de qPCR apresentou valores um pouco acima para este parâmetro em relação ao método de CPP, isso pode ser justificado pelo fato da técnica qPCR quantificar

células não viáveis, como já foi mencionado anteriormente. Apesar disso, os valores dos parâmetros de crescimento estão dentro do intervalo de confiança estudado (IC 95%) para o método qPCR, quando comparados aos valores obtidos por CPP. Os valores dos índices estatísticos do desempenho do modelo de BAR estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.8 Índices estatísticos do ajuste de BAR aos dados de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* pelos métodos de CPP e qPCR.

Índices	Método	4 °C	8 °C	14 °C	20 °C	30 °C
RMSE	CPP	0,1656	0,1647	0,1352	0,1334	0,1657
	qPCR	0,3563	0,1385	0,2576	0,2153	0,5022
R <sup>2</sup>	CPP	0,9950	0,9954	0,9960	0,9970	0,9956
	qPCR	0,9731	0,9967	0,9877	0,9926	0,9580
Exatidão	CPP	1,3056	1,3390	1,2344	1,2540	1,3269
	qPCR	1,7554	1,2603	1,4970	1,4045	2,5183
Bias	CPP	1,0012	1,0000	1,0006	1,0020	1,0001
	qPCR	1,0300	1,0021	1,0018	1,1000	0,9912

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

De modo geral, o modelo de BAR apresentou um bom ajuste aos dados para ambos os métodos e temperaturas de incubação avaliados, com baixos valores de RMSE e os valores do fator Bias e fator exatidão ficaram próximos de 1, os valores de R<sup>2</sup> acima de 0,95.

#### 4.3 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DE *L. mesenteroides* E *W. viridescens* EM CULTURA MISTA

As BAL *L. mesenteroides* e *W. viridescens* apresentam características morfológicas muito semelhantes, desse modo o método de CPP não permite a diferenciação dessas cepas, fazendo-se necessária a utilização de uma técnica que permita essa diferenciação. Dessa forma, realizou-se ensaios de qPCR para quantificação das BAL, em reações individuais.

##### 4.3.1 Rendimento e qualidade do DNA

O rendimento e a qualidade do DNA extraído da cultura mista na T de 30 °C foram medidos como descrito na sessão 3.2.2.2, e os dados estão dispostos na Tabela 4.8.

Tabela 4.9 Rendimento e Pureza do DNA extraído na curva de crescimento na temperatura 30°C de cultura mista de *Leuconostoc mesenteroide* e *Weissella viridescens*.

Tempo de cultivo (horas)	Rendimento (ng/μL)	Pureza (260/280)
0	4,0 ± 0,6	1,63 ± 0,3
2	6,2 ± 0,8	1,31 ± 0,2
4	4,9 ± 1,1	1,41 ± 0,0
6	6,6 ± 0,7	1,82 ± 0,1
8	6,7 ± 0,9	1,31 ± 0,4
10	6,0 ± 0,4	1,52 ± 0,2
12	8,5 ± 1,2	1,44 ± 0,2
16	9,4 ± 0,8	1,71 ± 0,5
18	12,4 ± 2,1	2,04 ± 0,3
20	18,4 ± 1,2	1,97 ± 0,0
22	19,5 ± 0,9	1,98 ± 0,4
24	33,4 ± 0,7	1,93 ± 0,1
		Média = 1,67 ± 0,3

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

A análise de pureza foi realizada para avaliar a qualidade do DNA extraído de acordo com a razão de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  (NANODROP, 2007). Como pode ser observado na Tabela 4.8, a média dessa razão foi  $1,67 \pm 0,3$ . Observou-se também que, com o aumento do tempo de cultivo, houve um aumento no rendimento do DNA que variou de 4,0 ng/ μL no início do cultivo (hora 0) a 33,4 ng/ μL após 24 h de cultivo, quando atingiu-se a fase estacionária de crescimento.

### 4.3.2 Ensaio de qPCR para elaboração das curvas de crescimento

Os ensaios de qPCR para elaboração das curvas de crescimento em cultura mista foram realizados individualmente para cada BAL e elaborados em quadruplicata.

#### 4.3.2.1 Elaboração das curvas de crescimento

Na Tabela 4.9, estão dispostos os valores de Ct e Tm para *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, presentes na cultura mista, obtidos em reações independentes, utilizando os iniciadores SCAR e *RecN*, respectivamente, em ensaios de qPCR.

Tabela 4.10 Valores de Ct e Tm obtidos por qPCR de reação independentes para *L. mesenteroides* e *W. viridescens* na temperatura isotérmica de 30 °C.

Tempo de Cultivo (h)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		<i>Weissella viridescens</i>	
	Ct <sup>a</sup>	Tm (° C) <sup>b</sup>	Ct <sup>a</sup>	Tm (° C) <sup>b</sup>
0	31,66 ± 0,4	82,16 ± 0,1	30,71 ± 0,1	80,95 ± 0,0
2	31,42 ± 0,2	82,06 ± 0,1	30,51 ± 0,1	81,00 ± 0,2
4	30,84 ± 0,6	82,13 ± 0,2	29,10 ± 0,2	80,97 ± 0,0
6	27,92 ± 0,2	82,11 ± 0,2	28,37 ± 0,2	80,90 ± 0,1
8	25,66 ± 0,7	82,03 ± 0,2	27,48 ± 0,3	80,95 ± 0,0
10	21,83 ± 0,7	82,00 ± 0,1	24,81 ± 0,0	80,75 ± 0,3
12	20,52 ± 0,6	82,02 ± 0,2	24,97 ± 0,0	80,90 ± 0,1
16	15,22 ± 0,6	82,12 ± 0,3	21,41 ± 0,3	80,90 ± 0,1
18	14,05 ± 0,3	82,06 ± 0,2	20,08 ± 0,6	80,85 ± 0,1
20	13,84 ± 0,7	82,09 ± 0,2	20,40 ± 0,4	80,90 ± 0,1
22	15,23 ± 0,3	82,02 ± 0,1	21,33 ± 0,1	80,95 ± 0,0
24	14,18 ± 0,3	82,15 ± 0,1	20,03 ± 0,9	81,00 ± 0,0

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

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Os valores médios de Ct para *L. mesenteroides* variaram entre 14,18 a 31,66 e para *W. viridescens* essa variação foi de 20,03 a 30,71. Foi observado que os valores de Ct para *W. viridescens* foram relativamente altos em relação aos encontrados para cultura mista, que variaram de 8,61 a 25,7 o que se conclui que houve uma inibição do crescimento da mesma em cultura mista com *L. mesenteroides*, que pode ser melhor visualizada na Figura 4.11 (B). Nota-se que, em relação ao crescimento dessa bactéria em cultura pura, em cultura mista, a bactéria cresceu bem menos.

Para cada BAL, observou-se a mesma tendência nos valores da Tm encontrada para *L. mesenteroides* em cultura pura (ANEXO C) com valores em torno de 82 °C, evidenciando a especificidade das reações de qPCR. Os valores de Tm para *W. viridescens* variaram entre 80,75 a 81 °C, resultados semelhantes aos encontrados em estudos anteriores do grupo de pesquisa do ENGEBIO – UFSC, para *W. viridescens* em cultura pura em que a Tm média foi ~81 °C. Ilha et al. (2016) utilizaram as reações de qPCR para quantificar de *Lb. paracasei* em matriz alimentar (cultura mista) e comprovaram a especificidade das reações por meio dos valores de Tm.

Para elaboração das curvas de crescimento de *L. mesenteroides* em cultura mista, foram utilizados os valores de Ct para calcular a concentração (log UFC/mL) através da curva padrão já estabelecida em cultura pura, na T de 30 °C (Figura 4.5 (E)). Para *W. viridescens*, os valores de Ct foram correlacionados com a equação da curva padrão que foi pré-estabelecida pelo grupo de pesquisa do ENGEBIO – UFSC como sendo:  $Ct = -3,06(\log \text{ UFC/mL}) + 38,03$  com valor de R<sup>2</sup> de 0,9979.

Para a seleção do modelo primário de crescimento para *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista, foram utilizados os valores dos índices estatísticos RMSE,  $R^2$ , fator bias e fator de exatidão, comparando o ajuste dos modelos de Baranyi e Roberts (BAR) e Gompertz (GO) aos dados experimentais. Os dados estão dispostos na Tabela 4.10.

Tabela 4.11 Valores dos índices estatísticos RMSE,  $R^2$ , bias e exatidão para o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts e o modelo de Gompertz às curvas de crescimento isotérmico de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista na temperatura isotérmica de 30 °C.

Índices	Modelo	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. viridescens</i>
RMSE	BAR	0,631	0,210
	GO	0,225	0,229
$R^2$	BAR	0,931	0,980
	GO	0,991	0,977
Bias	BAR	0,95	0,98
	GO	1,07	0,97
Exatidão	BAR	3,03	1,398
	GO	1,14	1,221

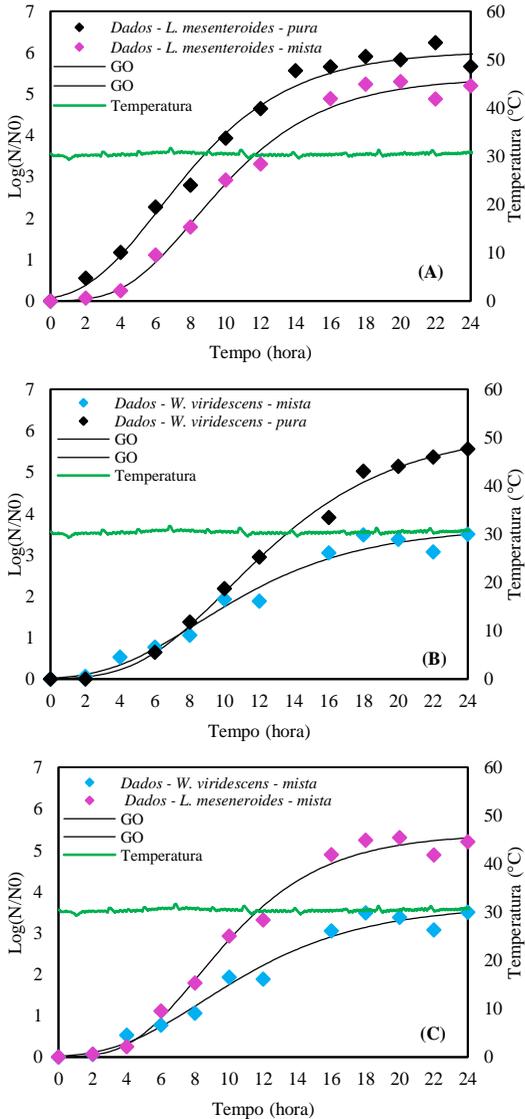
Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Como pode ser observado na Tabela 4.10 o modelo de GO se mostrou mais eficiente, apresentando melhores valores para os índices estatísticos, desta forma este foi o modelo selecionado para determinar os parâmetros primários de crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista, na condição isotérmica de 30 °C.

Na Figura 4.10, têm-se as curvas de crescimento pra *L. mesenteroides* (A), *W. viridescens* (B) em cultura pura e cultura mista e o destaque as curvas de crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista para uma melhor visualização da inibição ocorrida (C), curvas essas obtidas por qPCR e o ajuste do modelo de GO às mesmas.

As curvas de crescimento foram elaboradas para avaliar o uso do método de qPCR na quantificação de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista. As curvas em cultura pura que foram obtidas previamente para cada uma das BAL foram utilizadas para comparar o comportamento das mesmas (Figura 4.10).

Figura 4.10 Curvas de crescimento de *L. mesenteroides* (A) e *W. viridescens* (B) em cultura pura e mista, destaque para a inibição sofrida por *W. viridescens* na cultura mista (*L. mesenteroides* contra *W. viridescens*) (C) e ajuste do modelo de Gompertz modificado (GO).



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

No geral, observou-se que as curvas de crescimento para as BAL em cultura mista não foram semelhantes, sendo que, apenas a *L. mesenteroides* apresentou um formato sigmoide, apesar do cultivo ter sido realizado na temperatura ótima de crescimento (30 °C), evidenciando que a BAL *L. mesenteroides* inibiu o crescimento de *W. viridescens*. Diez et al., (2009), em seu estudo sobre as alterações microbianas, sensoriais e voláteis durante o armazenamento de morcilla de Burgos inoculados com *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, observaram que a BAL *W. viridescens* teve um crescimento mais lento que a *L. mesenteroides*. Essa mesma tendência foi verificada por Vermeiren et al., (2005).

O modelo de GO foi ajustado aos dados de crescimento de cada BAL para obtenção dos parâmetros (Tabela 4.11).

Tabela 4.12 Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz às curvas de crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista na temperatura isotérmica de 30°C.

Cepas	Parâmetros de crescimento		
	A (log UFC/mL)	$\lambda$ (h)	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )
<i>L. mesenteroides</i>	5,40	4,24	0,50
<i>W. viridescens</i>	3,67	3,30	0,26

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Os Parâmetros de crescimento para *L. mesenteroides* em cultura mista se mostraram próximos aos encontrados para a mesma em cultura pura (Tabela 4.11), confirmando que está BAL não sofreu influência em seu crescimento quando cultivada com a cepa *W. viridescens*, considerando um intervalo de confiança estudado (IC 95%), porém a BAL *W. viridescens* não apresentou o mesmo comportamento quando cultivada em cultura pura e mista, como pode ser observado através do ajuste do modelo de GO Figura 4.10 e Tabela 4.11.

O modelo de GO apresentou um bom ajuste aos dados de crescimento para ambas as cepas mostrando bons índices estatísticos, com o valor de RMSE baixo, os valores do fator bias e fator exatidão próximos a 1 e um valor de R<sup>2</sup> superior a 0,97.

## 5 CONCLUSÕES

As condições de ciclagem definidas para amplificação de *L. mesenteroides* por qPCR mostraram-se eficientes para quantificação da BAL em cultura pura e cultura mista, com curvas padrão, que correlacionam os métodos de CPP e qPCR, lineares e valores de  $R^2$  superiores a 0,97 e com eficiências maiores que 0,98.

As curvas de crescimento obtidas mostram que o método de qPCR, utilizado para quantificar *L. mesenteroides* em cultura pura nas condições isotérmicas (4, 8, 14, 20 e 30 °C), mostrou-se efetivo quando comparado com o método de CPP, com concentrações (Log UFC/mL) próximas para ambos os métodos. O teste de Correlação de Pearson e a análise de Bland-Altman mostram uma boa correlação e concordância entre os métodos de qPCR e CPP.

O modelo secundário, que apresenta melhor capacidade para descrever a influência da temperatura sobre o parâmetro  $\mu_{máx}$ , obtido pelo método de CPP é o modelo da raiz quadrada pois apresenta o valor de  $R^2$  superior a 0,99, representando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. O parâmetro  $y_{máx}$  apresentou uma variação mínima com a temperatura, sendo o seu valor considerado constante com a média dos valores obtidos.

O modelo não isotérmico estabelecido pelo método de CPP é válido para simular o crescimento de *L. mesenteroides* frente às flutuações de temperatura que podem acontecer durante o processamento, armazenamento e transporte de alimentos refrigerados. O modelo dinâmico de BAR apresenta uma boa predição, sendo validado pelos índices estatísticos RMSE, fator bias, fator exatidão e  $R^2$ .

O método de qPCR mostra-se eficiente para a quantificação de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista, tendo em vista que o método de CPP não permite a diferenciação dessas BAL. Sob as condições estudadas o crescimento de *W. viridescens* sofre uma inibição acentuada pela BAL *L. mesenteroides*.

O modelo de BAR mostra-se capaz de descrever o comportamento de *L. mesenteroides* em cultura pura, apresentando bom ajuste aos dados isotérmicos para ambos os métodos estudados, o modelo de GO apresenta um melhor ajuste aos dados experimentais para a cultura mista, com bons valores para os índices estatísticos fator bias, fator exatidão,  $R^2$  e RMSE.

De maneira geral, pode-se dizer que o emprego de metodologias rápidas como o método da qPCR para identificação e/ou quantificação de BAL é importante para a indústria de alimentos, por que permite o conhecimento da bactéria predominante na deterioração.

O conhecimento do mecanismo de inibição e/ou bioproteção das BAL é de grande importância para a indústria de produtos cárneos embalados a vácuo, pois permite o estabelecimento de parâmetros que possam levar ao aumento da vida útil desses alimentos.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- I. Modelar o crescimento de *L. mesenteroides* em cultura pura inoculada em matriz alimentar (produtos cárneos) utilizando métodos moleculares para sua quantificação.
- II. Uso de técnicas moleculares combinadas com microbiologia preditiva para diferenciação e estudo da cinética de crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL) em microbiota natural de produtos cárneos.
- III. Estudo da vida útil de produtos cárneos refrigerados e embalados a vácuo, utilizando qPCR combinada com microbiologia preditiva.

## REFERÊNCIAS

ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Evaluation of qPCR and plate counting for quantifying thermophilic starters in cheese. **Food Microbiology**, v. 65, p. 149–159, 2017.

AKKERMANS, S. et al. Introducing a novel interaction model structure for the combined effect of temperature and pH on the microbial growth rate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 240, n. 4, p. 4, 2016.

AMMOR, S. et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 2 - Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lac. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 462–468, 2006.

AMPE, F.; BEN OMAR, N.; GUYOT, J. P. Culture-independent quantification of physiologically-active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: Application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 131–140, 1999.

AUGUSTIN, J.; ROSSO, L.; CARLIER, V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 169–181, 2000.

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

BARANYI, J. et al. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 61–75, 1995.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M. L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 103–120, 1996.

BURGAIN, J. et al. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **advances in colloid and interface science**, v. 213, p. 21–35, 2014.

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

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

CARVALHO, N. L. Detecção e contagem de *Streptococcus agalactiae* em leite bovino pela reação em cadeia da polimerase. **Universidade de São Paulo**, 2013.

CATTANI, F. Detecção e quantificação de células viáveis de *Bacillus sporothermodurans* e de *Bacillus cereus* em leite através de PCR convencional e de PCR em tempo real associadas ao propídio monoazida. Detecção e quantificação de células viáveis de *Bacillus sporothermo*. 2012.

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, n. 6, p. 505–512, 2005.

CELLINI, F. et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 1089–1125, 2004.

CHOWDHURY, B. R.; CHAKRABORTY, R.; CHAUDHURI, U. R. Validity of modified Gompertz and Logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin AcH. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 4, p. 1171–1175, 2007.

CHRIST, E. Understanding of stuck fermentations: investigations on the relationship between the microbial diversity and chemical composition of must. **Institut für Mikrobiologie und Weinforschung**, p. 93, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation ; Approved Guideline.CLSI Document EP17-A**. [s.l: s.n.], v. 24

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

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, n. 1, p. 114–121, 2012.

CORRADINI, M. G. et al. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 223–228, 2006.

DALCANTON, F. Modelagem Matemática Do Crescimento De Bactérias Ácido Lácticas Em Condições Isotérmicas E Não Isotérmicas. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 190, 2010.

DE BRUYNE, K. et al. Lactobacillus fabifermentans sp. nov. and Lactobacillus cacaonum sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 7–12, 2009.

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

DIBBERN, A. G. Detecção e contagem de Staphylococcus aureus e Streptococcus agalactiae no leite por PCR em tempo real. **Universidade de São Paulo**, 2014.

DIEZ, A. M. et al. Microbial, sensory and volatile changes during the anaerobic cold storage of morcilla de Burgos previously inoculated with Weissella viridescens and Leuconostoc mesenteroides. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2–3, p. 168–177, 2009.

DINON, A. Z. Desenvolvimento de iniciadores e sondas para detecção de cry1A.105 e cry2Ab2 e aplicação de pcr e pcr em tempo real para detecção de ogm em alimentos. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 129, 2011.

DOULGERAKI, A. I. et al. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 130–141, 2012.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, v. 74, n. 4, p. 690–696, 2006.

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

FERNANDO, D. et al. Analysing the lag – growth rate relationship of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 197–201, 2002.

FERRER, J. et al. Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 2–8, 2009.

FOROOTAN, A. et al. Biomolecular Detection and Quantification. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 12, n. April, p. 1–6, 2017.

FU, B.; LABUZA, T. Considerations for the application of time-temperature integrators in food distribution. **J Food Distr Res**, v. February, n. 92, p. 9–18, 1992.

FUSCO, V. et al. The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, 2015.

GARCÍA-GIMENO, R. M. et al. Modelling the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by Artificial Neural Networks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 317–332, 2005.

GEITENES, S. et al. Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados a Vácuo Growth Modeling of Lactic Acid Bacteria and Microbiological Analysis in Two Types of Sliced Vacuum Package Cooked Ham Intr. **Revista Ciências Exatas e Naturais -RECEN**, v. 15, n. 1, p. 113–133, 2013.

GHANBARI, M. et al. LWT - Food Science and Technology Seafood biopreservation by lactic acid bacteria e A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 315–324, 2013.

GÓMEZ-ROJO, E. M. et al. International Journal of Food Microbiology A novel real-time PCR assay for the specific identification and quantification of *Weissella viridescens* in blood sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 215, p. 16–24, 2015.

GOSPAVIC, R. et al. Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 290–297, 2008.

GRATTEPANACHE, F. et al. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 414–421, 2005.

GUILLIER, L. Predictive Microbiology Models and Operational Readiness. **Procedia Food Science**, v. 7, n. 0, p. 133–136, 2016.

HAMASAKI, Y. et al. Behavior of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria Isolated from Spoiling Cooked Meat Products Behavior of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria Isolated from Spoiling Cooked Meat Products. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3668–3671, 2003.

HAN, Y. et al. Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. **Meat Science**, v. 88, n. 4, p. 682–688, 2011.

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

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

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, 1993.

HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH PS, G. R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology**, v. 10, p. 413–417, 1992.

HINGSTON, P. et al. Genotypes associated with *Listeria monocytogenes* isolates displaying impaired or enhanced tolerances to cold, salt, acid, or desiccation stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–20, 2017.

HUANG, L. International Journal of Food Microbiology IPMP 2013 — A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology ☆. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 100–107, 2014.

HUANG, L.; HWANG, C. A.; PHILLIPS, J. Evaluating the Effect of Temperature on Microbial Growth Rate-The Ratkowsky and a Bělehrádek-Type Models. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, 2011.

IMPE, J. F. VAN; MARTENS, T.; BAERDEMAEKER, J. DE. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food Dynamic Mathematical Model To Predict Microbial Growth and Inactivation during Food Processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2901–2909, 1992.

JOHN BUTLER. **Forensic DNA Typing**. 2nd Editio ed. [s.l.: s.n.].

JONES, R. J. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 273–282, 2004.

JUNEJA, V. K. et al. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. **Food Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 328–335, 2007.

JUNG, J. Y. et al. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 378–387, 2012.

KAMENÍK, J. et al. Lactic acid bacteria in hot smoked dry sausage (non-fermented salami): Thermal resistance of *Weissella viridescens* strains isolated from hot smoked dry sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 492–495, 2015.

KOUTSOUMANIS, K. P.; LIANOU, A.; GOUGOULI, M. Last developments in foodborne pathogens modeling. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 89–98, 2016.

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

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, v. 52, n. 3, p. 299–305, 1999.

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

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

LEE, Y. J. et al. Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. **Food Control**, v. 44, p. 16–21, 2014.

LEISNER, J. J. et al. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 19–24, 2000.

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

MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: Preliminary screening. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology**, v. 205, n. 1, p. 25–30, 1997.

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

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

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

MAYO, B.; SINDEREN, D.; VENTURA, M. Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications. **Current Genomics**, v. 9, n. 3, p. 169–183, 2008.

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 133–153, 2002.

MEJLHOLM, O.; BØKNÆS, N.; DALGAARD, P. Development and validation of a stochastic model for potential growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated lightly preserved seafood. **Food Microbiology**, v. 45, p. 276–289, 2015.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and psychrotolerant lactic acid bacteria in processed seafood and mayonnaise-based seafood salads. **Food Microbiology**, v. 46, n. April 2015, p. 1–14, 2015.

MENDONÇA, J. F. M. Detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho pela técnica de PCR em tempo real. **Universidade de Juiz de Fora**, 2016.

MENEZES, N. M. C. et al. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, v. 139, n. June 2017, p. 113–119, 2018.

MIRANDA-CASTILLEJA, D. E. et al. Distribution of native lactic acid bacteria in wineries of Queretaro, Mexico and their resistance to wine-like conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–9, 2016.

MOCALI, S. et al. Ecology of cold environments: New insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

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

MONTANARI, R. Cold chain tracking: a managerial perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 8, p. 425–431, 2008.

MOSER, A. et al. Detection and enumeration of *Lactobacillus helveticus* in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 68, p. 52–59, 2017.

MÜRMAN, L. et al. Temperaturas de conservadores a frio em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria/RS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, p. 30–34, 2004.

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.

NANTES, J.F.D.; MACHADO, J. G. C. F. Identificação de Gargalos Tecnológicos na Agroindústria Paranaense Resultados. **Ipardes**, p. 129, 2005.

NIVEN, C. F.; EVANS, J. B. SPECIES THAT PRODUCES A GREEN DISCOLORATION OF CURED MEAT PIGMENTS '. **journal bacteriology**, p. 758–759, 1956.

NOGVA, H. K. et al. Application of 5'-Nuclease PCR for Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Pure Cultures , Water , Skim Milk , and Unpasteurized Whole Milk. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 10, p. 4266–4271, 2000.

NYCHAS, G. J. E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1–2, p. 77–89, 2008.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5–6, p. 593–604, 2002.

OLIVEIRA, R. D. S. Optimization and use of real time pcr (qpcr) in the detection and quantification of active infection caused by betaherpesvirus in plasma samples from hematopoietic stem cells transplantation patients. **Universidade Estadual de Campinas**, p. 1–96, 2015.

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

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 989–993, 1993.

PATTERSON, M. F. et al. Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 266–273, 2010.

PEIRSON, M. D.; GUAN, T. Y.; HOLLEY, R. A. Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discolouration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 223–230, 2003.

PETRI, A. et al. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. v. 33, p. 48–54, 2013.

POTHAKOS, V. et al. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**, v. 109, p. 66–74, 2015.

QUINTO, E. J.; MARÍN, J. M.; SCHAFFNER, D. W. Effect of the competitive growth of *Lactobacillus sakei* MN on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in model meat gravy. **Food Control**, v. 63, n. May 2016, p. 34–45, 2016.

RATKOWSKY, D. A. et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 3, p. 1222–1226, 1982.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of hly, iap, and lin02483 Targets and AmpliFluor Technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1366–1377, 2004.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A.; BARANYI, J. Predictive microbiology and food safety. **Encyclopedia of Food Microbiology**, volume 3, v. 3, p. 1699–1710, 2000.

SAMBROOK, M. R. G. J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4th edition. [s.l.: s.n.].

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 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329–340, 2000.

SANT'ANNA, F. M. Bactérias do ácido láctico de silagem , água , leite , soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes : isolamento , identificação molecular , avaliações in vitro e in vivo do potencial probiótico. **Dissertação de mestrado pós graduação em Ciência Animal , Universidade Federal de Minas Gerais**, p. 107, 2014.

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

SCARIOT, M. C. et al. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, n. August 2017, p. 1–7, 2018.

SCHWENDIMANN, L. et al. Development of a quantitative PCR assay for rapid detection of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* in cocoa bean fermentation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 115, p. 94–99, 2015.

SELIM, A. S. M. et al. Development and assessment of a real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of a novel thermotolerant bacterium, *Lactobacillus thermotolerans*, in chicken feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4214–4219, 2005.

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

SILVA, N. B. DA et al. Mathematical Modeling of *Lactobacillus Viridescens* Growth in Vacuum Packed Sliced Ham under non Isothermal Conditions. **Procedia Food Science**, v. 7, p. 33–36, 2016.

SMITH-SIMPSON, S. et al. Estimating microbial growth parameters from non-isothermal data: A case study with *Clostridium perfringens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 294–303, 2007.

SOLIERI, L.; GIUDICI, P. Development of a sequence-characterized amplified region marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 23, p. 7765–7774, 2010.

SOPER et al. On the Distribution of the Correlation Coefficient in Small Samples. Appendix II to the Papers of “Student” and R. A. Fisher. **Biometrika**, v. 11, n. 4, p. 328–413, 1916.

STREMEL, D. P. et al. Avaliação De Diferentes Rotas De Produção De Etanol Biocombustível a Partir De Resíduos De Indústrias Lácteas<sup>1</sup>. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 2, p. 1–10, 2013.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 2004.

VAERMAN, J. L.; SAUSSOY, P.; INGARGIOLA, I. Evaluation of real-time PCR data. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 18, n. 2, p. 212–214, 2004.

VAN HYLCKAMA VLIEG, J. E. T.; HUGENHOLTZ, J. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1290–1297, 2007.

VAN IMPE, J. F. et al. Towards a novel class of predictive microbial growth models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 97–105, 2005.

VELD, H. IN’T. Microbial and biochemical spoilage of foods : an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 1–18, 1996.

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

VITZTHUM, F. et al. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, v. 276, n. 1, p. 59–64, 1999.

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

WU, G. P.; CHEN, S. H.; LEVIN, R. E. Application of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead cells of *Salmonella enterica* by real-time loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 117, p. 41–48, 2015.

XANTHIAKOS, K. et al. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1289–1298, 2006.

YE, K. et al. Development and validation of a molecular predictive model to describe the growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged chilled pork. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 246–254, 2013.

YENI, F. et al. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. **Food Control**, v. 40, n. 1, p. 359–367, 2014.

YOST, C. K.; NATTRESS, F. M. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 129–133, 2000.

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

ZHAO, J. et al. Modeling and predicting the effect of temperature on the growth of *Proteus mirabilis* in chicken. **Journal of Microbiological Methods**, v. 99, n. 1, p. 38–43, 2014.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.



A

## APÊNDICE A – Valores de Ct obtidos para elaboração das curvas padrão.

Planilha 1 – Valores de Ct das reações de qPCR para as diluições seriadas do DNA de *Leuconostoc mesenteroides* nas cinco temperaturas estudadas.

Cultivo 4°C			Cultivo 8°C		
DNA por reação (ng)	(UFC/mL) <sup>a</sup>	Ct <sup>b</sup>	DNA por reação (ng)	(UFC/mL) <sup>a</sup>	Ct <sup>b</sup>
12,9	2,9x10 <sup>9</sup>	13,56 ± 0,2	11,1	10x10 <sup>9</sup>	6,87 ± 0,0
12,9x10 <sup>-1</sup>	2,9x10 <sup>8</sup>	16,38 ± 0,8	11,1x10 <sup>-1</sup>	10x10 <sup>8</sup>	9,15 ± 0,2
12,9x10 <sup>-2</sup>	2,9x10 <sup>7</sup>	20,71 ± 0,3	11,1x10 <sup>-2</sup>	10x10 <sup>7</sup>	12,93 ± 0,3
12,9x10 <sup>-3</sup>	2,9x10 <sup>6</sup>	23,40 ± 0,3	11,1x10 <sup>-3</sup>	10x10 <sup>6</sup>	15,53 ± 0,4
12,9x10 <sup>-4</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>	27,58 ± 0,5	11,1x10 <sup>-4</sup>	10x10 <sup>5</sup>	19,36 ± 0,1
12,9x10 <sup>-5</sup>	2,9x10 <sup>4</sup>	30,87 ± 1,2	11,1x10 <sup>-5</sup>	10x10 <sup>4</sup>	23,04 ± 0,1
12,9x10 <sup>-6</sup>	2,9x10 <sup>3</sup>	31,05 ± 0,2	11,1x10 <sup>-6</sup>	10x10 <sup>3</sup>	26,79 ± 0,2
			11,1x10 <sup>-7</sup>	10x10 <sup>2</sup>	30,00 ± 0,5
			11,1x10 <sup>-8</sup>	10x10 <sup>1</sup>	32,81 ± 0,7
			11,1x10 <sup>-9</sup>	10	37,31 ± 0,4
Cultivo 14°C			Cultivo 20°C		
DNA por reação (ng)	(UFC/mL) <sup>a</sup>	Ct <sup>b</sup>	DNA por reação (ng)	(UFC/mL) <sup>a</sup>	Ct <sup>b</sup>
10,3	4,5x10 <sup>9</sup>	10,13 ± 0,1	11,5	2,7x10 <sup>9</sup>	9,55 ± 0,6
10,3x10 <sup>-1</sup>	4,5x10 <sup>8</sup>	13,12 ± 0,1	11,5x10 <sup>-1</sup>	2,7x10 <sup>8</sup>	11,66 ± 0,4
10,3x10 <sup>-2</sup>	4,5x10 <sup>7</sup>	16,55 ± 0,2	11,5x10 <sup>-2</sup>	2,7x10 <sup>7</sup>	15,00 ± 0,3
10,3x10 <sup>-3</sup>	4,5x10 <sup>6</sup>	20,39 ± 0,3	11,5x10 <sup>-3</sup>	2,7x10 <sup>6</sup>	18,54 ± 0,1
10,3x10 <sup>-4</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	24,10 ± 0,1	11,5x10 <sup>-4</sup>	2,7x10 <sup>5</sup>	22,35 ± 0,7
10,3x10 <sup>-5</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	27,48 ± 0,0	11,5x10 <sup>-5</sup>	2,7x10 <sup>4</sup>	26,00 ± 0,5
10,3x10 <sup>-6</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	31,29 ± 0,5	11,5x10 <sup>-6</sup>	2,7x10 <sup>3</sup>	29,40 ± 0,2
10,3x10 <sup>-7</sup>	4,5x10 <sup>2</sup>	33,69 ± 0,3	11,5x10 <sup>-7</sup>	2,7x10 <sup>2</sup>	30,45 ± 0,1
10,3x10 <sup>-8</sup>	4,5x10 <sup>1</sup>	31,22 ± 0,2			
Cultivo 30°C					
DNA por reação (ng)	(UFC/mL) <sup>a</sup>	Ct <sup>b</sup>			
12,5	3,0x10 <sup>9</sup>	11,17 ± 0,5			
12,5x10 <sup>-1</sup>	3,0x10 <sup>8</sup>	14,29 ± 0,3			
12,5x10 <sup>-2</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	17,55 ± 0,2			
12,5x10 <sup>-3</sup>	3,0x10 <sup>6</sup>	21,85 ± 0,1			
12,5x10 <sup>-4</sup>	3,0x10 <sup>5</sup>	25,23 ± 0,8			
12,5x10 <sup>-5</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	29,61 ± 0,6			
12,5x10 <sup>-6</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>	32,95 ± 0,3			
12,5x10 <sup>-7</sup>	3,0x10 <sup>2</sup>	35,40 ± 0,5			
12,5x10 <sup>-8</sup>	3,0x10 <sup>1</sup>	35,40 ± 0,4			

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

## APÊNDICE B – Rendimento e Pureza do DNA extraído.

Planilha 2 – Rendimento e Pureza do DNA extraído na curva de crescimento nas temperaturas de 4, 8, 14 e 20 °C de *Leuconostoc mesenteroides*.

Tempo de cultivo (horas)	Rendimento (ng/μL)	Pureza (260/280)	Tempo de cultivo (horas)	Rendimento (ng/μL)	Pureza (260/280)
<b>Cultivo 4°C</b>			<b>Cultivo 8°C</b>		
0	2,9 ± 0,8	2,06 ± 0,1	0	3,4 ± 0,8	1,59 ± 0,6
98	3,4 ± 1,6	1,90 ± 0,2	23	3,7 ± 1,6	1,94 ± 0,1
190	3,1 ± 1,2	1,72 ± 0,4	47	3,8 ± 1,2	2,03 ± 0,2
281	3,4 ± 1,7	1,83 ± 0,0	94,5	4,1 ± 1,7	1,76 ± 0,1
354	3,9 ± 2,1	2,04 ± 0,0	120,3	4,7 ± 2,1	1,54 ± 0,5
421	5,2 ± 1,9	1,64 ± 0,1	143	5,1 ± 1,9	1,47 ± 0,0
518	5,1 ± 1,3	2,20 ± 0,3	166,5	5,6 ± 1,3	1,72 ± 0,1
640	5,0 ± 1,4	1,58 ± 0,1	190	5,2 ± 1,4	1,52 ± 0,1
760	6,5 ± 0,9	1,44 ± 0,1	214	5,9 ± 0,9	1,78 ± 0,0
927,8	6,6 ± 0,7	1,47 ± 0,6	262,7	6,8 ± 0,7	1,58 ± 0,1
1.019,5	7,7 ± 0,8	1,43 ± 0,1	310,2	7,8 ± 0,8	1,56 ± 0,1
1.119,5	9,4 ± 0,8	1,88 ± 0,1	334,5	11,1 ± 0,6	1,81 ± 0,5
1.211	12,9 ± 0,6	1,66 ± 0,3			Média = 1,69 ± 0,2
		Média = 1,75 ± 0,2			
Tempo de cultivo (horas)	Rendimento (ng/μL)	Pureza (260/280)	Tempo de cultivo (horas)	Rendimento (ng/μL)	Pureza (260/280)
<b>Cultivo 14°C</b>			<b>Cultivo 20°C</b>		
0	3,8 ± 1,6	1,56 ± 0,1	0	4,4 ± 0,6	2,08 ± 0,4
6	4,1 ± 0,8	1,81 ± 0,2	6	4,2 ± 0,8	1,91 ± 0,4
12	5,0 ± 1,5	1,53 ± 0,4	10	4,2 ± 1,1	2,36 ± 0,5
18	5,3 ± 0,6	1,43 ± 0,0	14	3,3 ± 0,7	2,43 ± 0,4
24	4,3 ± 0,7	1,65 ± 0,0	18	4,7 ± 0,9	1,65 ± 0,1
30	4,9 ± 1,4	1,72 ± 0,1	22	4,9 ± 0,4	1,55 ± 0,2
36	5,4 ± 0,7	1,41 ± 0,3	26	5,8 ± 1,2	1,67 ± 0,1
42	6,9 ± 0,7	1,65 ± 0,1	30	7,4 ± 0,8	1,76 ± 0,6
48	7,8 ± 1,4	1,69 ± 0,1	34	6,4 ± 2,1	1,78 ± 0,2
60	6,9 ± 0,9	1,38 ± 0,6	38	8,8 ± 1,2	1,47 ± 0,0
74	9,8 ± 0,7	1,85 ± 0,1	43	9,8 ± 0,9	1,66 ± 0,2
84	10,3 ± 0,5	1,67 ± 0,1	47	11,5 ± 0,7	1,92 ± 0,1
		Média = 1,61 ± 0,1			Média = 1,85 ± 0,3

Fonte: Elaborada pelo autor (2018)

Planilha 3 - Rendimento e Pureza do DNA extraído na curva de crescimento na temperatura 30 °C de *Leuconostoc mesenteroides*.

<b>Tempo de cultivo (horas)</b>	<b>Rendimento (ng/μL)</b>	<b>Pureza (260/280)</b>
<b>Cultivo 30°C cultura pura</b>		
<b>0</b>	4,6 ± 1,3	1,56 ± 0,0
<b>2</b>	4,0 ± 0,6	1,24 ± 0,2
<b>6</b>	5,6 ± 0,5	1,56 ± 0,1
<b>8</b>	6,2 ± 0,7	1,94 ± 0,1
<b>10</b>	5,9 ± 1,1	1,43 ± 0,4
<b>12</b>	7,2 ± 0,8	1,55 ± 0,2
<b>14</b>	7,6 ± 0,5	1,50 ± 0,2
<b>16</b>	6,6 ± 1,4	1,63 ± 1,0
<b>18</b>	8,6 ± 0,8	1,79 ± 0,1
<b>20</b>	9,9 ± 0,3	1,70 ± 0,1
<b>24</b>	12,5 ± 0,9	1,40 ± 0,2
		Média = 1,57 ± 0,2

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

## APÊNDICE C – Valores de Ct e Tm e quantificação (Log UFC/mL) por CPP e qPCR.

Valores de Ct, Tm e quantificação (Log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* por CPP e qPCR na temperatura de 4 °C.

Tempo de cultivo (horas)	CPP Log UFC/mL <sup>a</sup>	qPCR Ct <sup>b</sup>	qPCR Tm <sup>c</sup>	qPCR Log UFC/mL <sup>d</sup>
<b>Cultivo 4°C</b>				
0	3,32 ± 0,2	30,95 ± 0,3	81,9 ± 0,3	3,60 ± 0,2
98	3,72 ± 0,0	30,03 ± 0,4	81,9 ± 0,4	3,89 ± 0,4
190	4,02 ± 0,4	28,36 ± 0,1	81,9 ± 0,4	4,42 ± 0,1
281	4,00 ± 0,2	28,88 ± 0,1	82,15 ± 0,7	4,25 ± 0,07
354	4,73 ± 0,2	27,51 ± 0,0	82,15 ± 0,2	4,69 ± 0,9
421	5,11 ± 0,0	25,64 ± 0,0	82,25 ± 0,4	5,28 ± 0,4
518	5,65 ± 0,3	22,70 ± 0,0	82,25 ± 0,8	6,21 ± 0,3
640	6,48 ± 0,2	19,99 ± 0,4	82,15 ± 0,3	7,07 ± 0,1
760	7,09 ± 0,3	20,41 ± 0,1	82,35 ± 0,0	6,94 ± 0,1
927,8	7,97 ± 0,1	16,86 ± 0,1	82,15 ± 0,2	8,06 ± 0,2
1019,5	8,22 ± 0,1	17,55 ± 0,2	82,35 ± 0,6	7,85 ± 0,6
1119,5	9,05 ± 0,2	13,38 ± 0,1	82,25 ± 0,7	9,17 ± 0,3
1211	9,47 ± 0,4	13,48 ± 0,4	82,4 ± 0,3	9,14 ± 0,1

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por contagem em placas em duplicata; <sup>b</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Ct obtidos em quadruplicata; <sup>c</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Tm obtidos em quadruplicata; <sup>d</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por qPCR em quadruplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Valores de Ct, Tm e quantificação (Log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* por CPP e qPCR na temperatura de 8 °C.

Tempo de cultivo (horas)	CPP Log UFC/mL <sup>a</sup>	qPCR Ct <sup>b</sup>	qPCR Tm <sup>c</sup>	qPCR Log UFC/mL <sup>d</sup>
<b>Cultivo 4°C</b>				
0	3,16 ± 0,2	25,58 ± 0,2	82,25 ± 0,1	3,67 ± 0,3
23	3,19 ± 0,4	24,74 ± 0,5	82,25 ± 0,1	3,92 ± 0,3
47	3,90 ± 0,4	24,52 ± 0,4	82,25 ± 0,1	3,99 ± 0,2
94,5	4,96 ± 0,2	20,39 ± 0,2	82,25 ± 0,2	5,23 ± 0,1
120,3	5,70 ± 0,3	17,79 ± 0,1	82,15 ± 0,2	6,02 ± 0,1
143	6,66 ± 0,3	15,17 ± 0,1	82,25 ± 0,3	6,81 ± 0,4
166,5	7,14 ± 0,2	13,47 ± 0,2	82,25 ± 0,2	7,32 ± 0,6
190	8,05 ± 0,1	11,31 ± 0,7	82,25 ± 0,1	7,97 ± 0,8
214	8,28 ± 0,1	8,83 ± 0,3	82,35 ± 0,4	8,72 ± 0,4
262,7	8,43 ± 0,2	7,50 ± 0,4	82,35 ± 0,2	9,12 ± 0,1
310,2	8,77 ± 0,3	6,63 ± 0,6	82,40 ± 0,6	9,38 ± 0,1
334,5	8,92 ± 0,4	6,93 ± 0,4	82,35 ± 0,3	9,30 ± 0,2

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por contagem em placas em duplicata; <sup>b</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Ct obtidos em quadruplicata; <sup>c</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Tm obtidos em quadruplicata; <sup>d</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por qPCR em quadruplicata.  
Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Valores de Ct, Tm e quantificação (Log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* por CPP e qPCR na temperatura de 8 e 14 °C.

Tempo de cultivo (horas)	CPP Log UFC/mL <sup>a</sup>	qPCR Ct <sup>b</sup>	qPCR Tm <sup>c</sup>	qPCR Log UFC/mL <sup>d</sup>
<b>Cultivo 8°C</b>				
0	3,16 ± 0,2	25,58 ± 0,2	82,25 ± 0,1	3,67 ± 0,3
23	3,19 ± 0,4	24,74 ± 0,5	82,25 ± 0,1	3,92 ± 0,3
47	3,90 ± 0,4	24,52 ± 0,4	82,25 ± 0,1	3,99 ± 0,2
94,5	4,96 ± 0,2	20,39 ± 0,2	82,25 ± 0,2	5,23 ± 0,1
120,3	5,70 ± 0,3	17,79 ± 0,1	82,15 ± 0,2	6,02 ± 0,1
143	6,66 ± 0,3	15,17 ± 0,1	82,25 ± 0,3	6,81 ± 0,4
166,5	7,14 ± 0,2	13,47 ± 0,2	82,25 ± 0,2	7,32 ± 0,6
190	8,05 ± 0,1	11,31 ± 0,7	82,25 ± 0,1	7,97 ± 0,8
214	8,28 ± 0,1	8,83 ± 0,3	82,35 ± 0,4	8,72 ± 0,4
262,7	8,43 ± 0,2	7,50 ± 0,4	82,35 ± 0,2	9,12 ± 0,1
310,2	8,77 ± 0,3	6,63 ± 0,6	82,40 ± 0,6	9,38 ± 0,1
334,5	8,92 ± 0,4	6,93 ± 0,4	82,35 ± 0,3	9,30 ± 0,2
<b>Cultivo 14°C</b>				
0	3,32 ± 0,2	29,06 ± 0,1	82,15 ± 0,3	3,35 ± 0,3
6	3,71 ± 0,04	26,98 ± 0,1	82,00 ± 0,2	4,00 ± 0,1
12	4,03 ± 0,3	25,61 ± 0,3	82,00 ± 0,1	4,43 ± 0,1
18	4,23 ± 0,5	24,65 ± 0,2	82,25 ± 0,1	4,73 ± 0,4
24	4,61 ± 0,7	22,61 ± 0,5	82,15 ± 0,4	5,37 ± 0,6
42	6,00 ± 0,02	20,15 ± 0,4	82,15 ± 0,1	6,14 ± 0,3
48	6,42 ± 0,5	18,88 ± 0,1	82,15 ± 0,1	6,54 ± 0,1
60	6,99 ± 0,3	15,95 ± 0,2	82,25 ± 0,2	7,46 ± 0,1
73,7	7,75 ± 0,1	12,29 ± 0,7	82,15 ± 0,2	8,60 ± 0,2
84	8,31 ± 0,1	11,80 ± 0,3	82,15 ± 0,3	8,76 ± 0,6
92	8,70 ± 0,0	11,34 ± 0,3	82,15 ± 0,5	8,90 ± 0,5
100	8,66 ± 0,2	10,34 ± 0,2	82,25 ± 0,4	9,21 ± 0,2

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por contagem em placas em duplicata; <sup>b</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Ct obtidos em quadruplicata; <sup>c</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Tm obtidos em quadruplicata; <sup>d</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por qPCR em quadruplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

Valores de Ct, Tm e quantificação (Log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* por CPP e qPCR na temperatura de 20 e 30 °C.

Tempo de cultivo (horas)	CPP Log UFC/mL <sup>a</sup>	qPCR Ct <sup>b</sup>	qPCR Tm <sup>c</sup>	qPCR Log UFC/mL <sup>d</sup>
<b>Cultivo 20 °C</b>				
0	3,10 ± 0,2	30,95 ± 0,1	82,25 ± 0,3	3,46 ± 0,1
6	4,12 ± 0,2	30,03 ± 0,1	82,15 ± 0,1	4,24 ± 0,2
10	4,62 ± 0,1	28,36 ± 0,2	82,15 ± 0,2	4,89 ± 0,2
14	5,48 ± 0,6	28,88 ± 0,3	82,15 ± 0,2	5,90 ± 0,4
18	6,35 ± 0,3	27,51 ± 0,1	82,25 ± 0,2	7,18 ± 0,3
22	7,12 ± 0,2	25,64 ± 0,4	82,35 ± 0,5	7,38 ± 0,2
26	7,73 ± 0,4	22,70 ± 0,5	82,35 ± 0,3	8,53 ± 0,1
30	8,34 ± 0,2	19,99 ± 0,2	82,40 ± 0,2	8,86 ± 0,5
34	8,81 ± 0,2	20,41 ± 0,6	82,15 ± 0,1	9,15 ± 0,1
38	9,06 ± 0,3	16,86 ± 0,4	82,25 ± 0,3	9,60 ± 0,1
43	9,29 ± 0,6	17,55 ± 0,1	82,25 ± 0,4	9,86 ± 0,1
47	9,44 ± 0,1	13,38 ± 0,1	82,35 ± 0,1	9,56 ± 0,1
<b>Cultivo 30 °C</b>				
0	3,74 ± 0,2	30,62 ± 0,2	82,25 ± 0,2	3,30 ± 0,1
2	4,29 ± 0,2	29,03 ± 0,1	82,25 ± 0,1	3,77 ± 0,1
6	6,00 ± 0,2	19,10 ± 0,1	82,25 ± 0,4	6,73 ± 0,3
8	6,54 ± 0,2	18,18 ± 0,1	82,15 ± 0,2	7,00 ± 0,2
10	7,67 ± 0,2	17,44 ± 0,2	82,15 ± 0,5	7,22 ± 0,4
12	8,38 ± 0,2	14,20 ± 0,3	82,15 ± 0,1	8,18 ± 0,2
14	9,30 ± 0,2	12,46 ± 0,1	82,35 ± 0,3	8,70 ± 0,1
16	9,39 ± 0,2	13,51 ± 0,2	82,25 ± 0,2	8,39 ± 0,2
18	9,64 ± 0,2	13,28 ± 0,4	82,35 ± 0,1	8,45 ± 0,1
20	9,57 ± 0,2	12,02 ± 0,3	82,35 ± 0,2	8,83 ± 0,3
22	9,98 ± 0,2	11,33 ± 0,2	82,25 ± 0,4	9,04 ± 0,2

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por contagem em placas em duplicata; <sup>b</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Ct obtidos em quadruplicata; <sup>c</sup> Média ± desvio padrão dos valores de Tm obtidos em quadruplicata; <sup>d</sup> Média ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por qPCR em quadruplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

## APÊNDICE D – Valores do parâmetro primário de crescimento $h_0$ do modelo de BAR para os métodos de CPP e qPCR.

Valores de  $h_0$  livre obtidos pelo ajuste do modelo de BAR aos dados de crescimento de *L. mesenteroides* em cultura pura, nas condições isotérmicas estudadas.

Temperatura (° C)	$h_0$ livre	
	Método	
	CPP	qPCR
4	0,93	1,22
8	1,71	1,80
14	0,53	1,32
20	0,47	1,21
30	1,64	1,54
	Média = 1,05	Média = 1,41
	<b>Média = 1,23 ± 0,2</b>	

