



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Wiaslan Figueiredo Martins

**Estabelecimento e comparação de modelos preditivos convencionais e moleculares para
descrever o crescimento de bactérias deteriorantes de produtos cárneos**

FLORIANÓPOLIS

2019

Wiaslan Figueiredo Martins

Estabelecimento e comparação de modelos preditivos convencionais e moleculares para descrever o crescimento de bactérias deteriorantes de produtos cárneos

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos. Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis

2019

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

Martins, Wiaslan Figueiredo

Estabelecimento e comparação de modelos preditivos convencionais e moleculares para descrever o crescimento de bactérias deteriorantes de produtos cárneos / Wiaslan Figueiredo Martins ; orientador, Gláucia Maria Falcão de Aragão, 2019.

178 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

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

Wiaslan Figueiredo Martins

Título: Estabelecimento e comparação de modelos preditivos convencionais e moleculares para descrever o crescimento de bactérias deteriorantes de produtos cárneos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Boris Stambuk, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Daniel Angelo Longhi, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Andreia Tremarin, Dr.(a)
Wifa Ingredientes

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia de Alimentos.

Prof.(a) Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.(a)
Coordenadora do Programa

Prof.(a) Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis, 2019.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina, e na *Universidad de Burgos* (Burgos, Espanha) e contou com recursos de financiamento e bolsas da CAPES.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Creuziene e Francisco (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus por sua bondade e força, ajudando a realizar este trabalho e superando os momentos difíceis.

Ao meu pai Francisco (in memoriam) que mesmo não estando hoje presente, foi quem me fez acreditar que esse sonho seria possível. Ele sempre quis que eu fosse doutor e hoje estou realizando o nosso sonho. Amo-te pai onde estiver. À minha mãe Creuziene, que em todos os momentos da minha vida foi a pessoa que sempre acreditou que tudo isso seria possível e foi a minha maior incentivadora, sempre me apoiando durante as dificuldades, se orgulhando das minhas conquistas e demonstrando todo o amor de uma grande mãe, amo-te!

A todos os meus familiares, em especial aos meus irmãos, Claudinha, Gilson, Aécio e Nídia pelo apoio quando eu mais precisei. Agradeço a ajuda nas horas mais difíceis.

À minha orientadora Profa. Dra. Gláucia, pelos ensinamentos, amizade e pela confiança na realização desta pesquisa. Agradeço a dedicação, o incentivo, as boas conversas e os conhecimentos transmitidos. Eu jamais irei esquecer de todo o aprendizado adquirido ao longo desses anos de convivência. Adoro-te, profa!

Muchas gracias al Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos (España) por su valiosa asistencia, orientación y apoyo financiero para llevar a cabo esta investigación, en particular a los profesores Dr. Jordi Rovira y Dra. Ana Diez ¡Gracias por todo!

Aos professores, Dr. Daniel Longhi, Dr. Boris Stambuk, Dra. Ana Carolina Arisi e Dra. Andréia Tremarin por terem aceitado contribuir com esta pesquisa, engrandecendo este trabalho. Um agradecimento em especial ao prof. Dr. Boris Stambuk por ter concedido o equipamento de qPCR para realização dos experimentos. Muito obrigado!

Um agradecimento em especial ao meu amigo Daniel Longhi que sempre me ajudou desde o mestrado, incentivando cada etapa até chegar aqui! Muito obrigado pelo apoio e incentivo, Dani!

Ao meu companheiro Gustavo, meu amigo e meu parceiro, pelo apoio constante, pelo incentivo, pelos elogios e, principalmente, pela paciência que teve comigo quando eu não passava

por bons momentos. Obrigado por escutar meus “desabafos acadêmicos”. Você sempre foi muito compreensivo e me incentivou até mesmo quando eu não acreditava que seria possível, sempre me colocou para cima! Você é um grande companheiro e parceiro! Amo-te.

Ao grupo PHB, minhas amigas Kellen, Pâmela e Carol, e meu amigo Felipe, foram muitos anos de laboratório juntos, companheirismo nas noites no lab. Obrigado pela torcida para que nossos experimentos dessem certos!!

Às minhas grandes amigas, Dani, Nati e Cami. Irei sentir muitas saudades das nossas manhãs, nossas tardes, nossas noites no lab, fora do lab, nossas confidências, nossas risadas, nossas jantinhas, nossos bolos, nosso tudo! Obrigado por tornarem o nosso trabalho mais alegre, mais divertido.

Um agradecimento especial para a minha grande amiga Dani, que se tornou minha companheira de pesquisa, aquela que você confia de olhos fechados, uma superamiga que sei que posso contar para sempre, tenho tanta sorte de você ter feito parte deste trabalho. Obrigado por tudo! Sem você esse trabalho não seria possível. Tenho muito orgulho da nossa amizade, adoro você e te levo no meu coração!

Agradeço ao “bus da Paraíba”, as minhas amigas, Ingrid, Dani, Natália, Josimária, Minela, Zélia, Fabíola, Jaízia, Nely e Angélica, que fizeram me sentir mais próximo da minha terra, obrigado!

Aos iniciantes científicos, Eduardo, Charles e Beatriz, por toda ajuda concedida na execução dos experimentos, pela amizade e dedicação.

A todos os colegas e amigos do antigo ENGEBIO, pelo apoio, incentivo e experiências compartilhadas, em especial à Denise e à Déia! Tenho um carinho muito grande por vocês! Obrigado por me ajudarem muito quando precisei de conselhos! Obrigado também aos professores.

Um agradecimento aos laboratórios: ao Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduo – LTBR/EQA/UFSC, pelo espaço cedido enquanto estávamos em reforma; ao Laboratório de Biologia Molecular e ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos – CCA/CAL/UFSC pelas cepas e equipamento fornecidos; ao Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – BQA/CCB/UFSC, ao Núcleo de Microbiologia de Alimentos do Laboratório de

Ciências e Tecnologia de Alimentos – CCA/UFSC e ao Laboratório de Farmacologia (professores, Dr. Anicleto Poli e Dr. Juliano Ferreira) pela disponibilidade de utilização de equipamentos.

Um agradecimento ao prof. Rafael de Armas, que me ensinou desde quando iniciei os experimentos com biologia molecular. Sua ajuda foi muito importante. Muito obrigado pela paciência!

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e durante o doutorado (sanduíche) na Espanha.

Por fim, a todos os meus familiares e amigos, que contribuíram de alguma forma para mais uma etapa vencida.

Muito Obrigado!

“Não é o que você faz. É a maneira como você faz. É isso que gera resultados.

(SY OLIVER; JAMES YOUNG, 1939)

RESUMO

O objetivo geral desta tese de doutorado foi comparar os métodos de contagem em placas (CP) e *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) para enumeração de bactérias ácido-lácticas (BAL) deteriorantes em cultura pura e mista e estabelecer modelos preditivos moleculares e convencionais para descrever as cinéticas de crescimento. Para isso, foram construídas curvas-padrão para *Weissella viridescens* e *Lactobacillus plantarum* e as curvas de crescimentos dessas espécies foram quantificadas por CP e por SYBR[®] Green qPCR em cultura pura e mista a 30 °C. No entanto, os valores obtidos por SYBR[®] Green qPCR foram superestimados quando comparados com o método de CP. Para diminuir esse viés, novas curvas-padrão foram construídas baseadas no crescimento de um coquetel de *W. viridescens* cultivadas a 4, 8, 14 e 30 °C de cultivo, utilizando o primeiro ponto da fase estacionária de crescimento para a construção dessas curvas. Com isso, os métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR foram adequados para quantificar a cinética do crescimento de *W. viridescens* em cultura pura em todas as temperaturas constantes, demonstrando uma boa correlação e concordância. Ainda, o método de SYBR[®] Green qPCR foi específico para quantificar a cultura mista de *W. viridescens* e *Leuconostoc mesenteroides* a 8 °C, com a diferenciação das cinéticas de crescimento. Diante disso, os dados de crescimento dessas espécies em cultura pura e mista foram utilizados para a obtenção dos parâmetros de crescimento por meio de ajustes de modelos preditivos. Os resultados provaram que os modelos de Baranyi e Roberts (BAR), Gompertz modificado e Logístico modificado foram adequados para descrever as curvas de crescimento de *W. viridescens* em cultura pura e da cultura mista dessa espécie com *L. mesenteroides* a 8 °C. No entanto, para verificar a eficiência dos métodos de CP e TaqMan[™] qPCR combinados com uma abordagem de microbiologia preditiva, curvas-padrão para a quantificação de *L. mesenteroides* e de *W. viridescens* em amostras de *morcilla* embalada a vácuo (MB) e armazenadas a 5, 8, 13 e 18 °C foram utilizadas. Ambos os métodos foram comparados, e uma análise de regressão linear demonstrou uma correlação linear altamente e estatisticamente significativa. Posteriormente, o modelo de BAR foi ajustado aos dados das curvas de crescimento para estimar os parâmetros cinéticos e modelos secundários foram usados para descrever a dependência desses parâmetros com a temperatura. Os resultados comprovaram que os modelos, primário e secundário, foram adequados para descrever as curvas de crescimento para ambas as bactérias e os dois métodos em MB. Em conclusão, os resultados de todos os experimentos comprovaram que os métodos de qPCR (baseados em SYBR[®] Green e TaqMan[™]) e de CP podem ser usados para descrever a cinética microbiana de crescimento de BAL em cultura pura e mista em diferentes condições isotérmicas. Além disso, os modelos primário e secundário podem ser usados para estabelecer modelos preditivos convencionais e moleculares para prever o crescimento de BAL em meio de cultivo (cultura pura e mista) e em produtos cárneos cozidos e embalados a vácuo com características semelhantes às da *morcilla*.

Palavras-chave: qPCR. Contagem em placas. Bactérias ácido-lácticas. Microbiologia preditiva. Deterioração.

ABSTRACT

This doctoral thesis aimed to compare plate count (PC) and quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) methods for enumeration of spoilage lactic acid bacteria (LAB) in pure and mixed culture and to establish molecular and conventional predictive models to describe growth kinetics. For this, standard curves were constructed for *W. viridescens* and *L. plantarum* and growth curves of these species were quantified by PC and SYBR® Green qPCR in the pure and mixed culture at 30 °C. However, the values obtained by SYBR® Green qPCR were overestimated when compared with the PC method. To reduce this bias, new standard curves were constructed based on the growth of a *W. viridescens* cocktail at 4, 8, 14 and 30 °C, using the first point of the stationary growth phase to construct these curves. Thus, the PC and SYBR® Green qPCR methods were adequate to quantify growth kinetics of *W. viridescens* in the pure culture at all isothermal temperatures, demonstrating a good correlation and agreement. Furthermore, the SYBR® Green qPCR method was specific for quantifying the mixed culture of *W. viridescens* and *Leuconostoc mesenteroides* at 8 °C, with differentiation of growth kinetics. Therefore, growth data of these species in pure and mixed culture were used to obtain growth parameters by fitting predictive models. The results proved that the Baranyi and Roberts (BAR), modified Gompertz and modified Logistic models were adequate to describe the growth curves of *W. viridescens* in pure culture and mixed culture of this species with *L. mesenteroides* at 8 °C. However, to verify the efficiency of the PC and TaqMan™ qPCR methods combined with a predictive microbiology approach, standard curves for the quantification of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in vacuum-packaged *morcilla* (VM) samples stored at 5, 8, 13 and 18 °C were used. Both methods were compared, and a linear regression analysis demonstrated a statistically significant linear correlation. Subsequently, the BAR model was fitted to the growth curve data to estimate the kinetic parameters and secondary models were used to establish the dependence of these parameters under isothermal conditions. The results proved that the primary and secondary models were adequate for describing the growth curves for both bacteria and both methods in VM. In conclusion, the results of all experiments proved that qPCR (based on SYBR® Green and TaqMan™) and PC methods could be used to construct growth kinetics microbial of LAB in pure and mixed culture under different isothermal conditions. Besides, the primary and secondary models could be used to establish conventional and molecular predictive models to predict LAB growth in culture medium (pure and mixed culture) and cooked vacuum-packaged meat products with characteristics similar to *morcilla*.

Keywords: qPCR. Plate count. Lactic acid bacteria. Predictive microbiology. Spoilage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1- Diagrama esquemático das fases de um ciclo da técnica da PCR.	45
Figura 4.2 - Mecanismo de ação do corante intercalante SYBR® Green.	47
Figura 4.3 - Mecanismo de ação da sonda de hidrólise TaqMan™.	48
Figura 5.1 - Curva-padrão obtida para <i>Weissella viridescens</i> em meio de cultivo. Gráficos representativos de amplificação. a) Aumento da fluorescência (ΔR_n) em relação ao número de ciclos de SYBR® Green qPCR para diluições em séries de <i>W. viridescens</i> correspondente a $4,2 \times 10^9$ (-◇-), $4,2 \times 10^7$ (-△-), $4,2 \times 10^5$ (-×-), $4,2 \times 10^3$ (-□-) UFC/mL, amostra controle (-○-) e limiar (-). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T obtidos por SYBR® Green qPCR em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de <i>W. viridescens</i>	63
Figura 5.2 - Curva-padrão obtida para <i>Lactobacillus plantarum</i> em meio de cultivo. Gráficos representativos de amplificação. a) Aumento da fluorescência (ΔR_n) em relação ao número de ciclos de qPCR para diluições em séries de <i>Lb. plantarum</i> correspondente a $4,3 \times 10^9$ (-◇-), $4,3 \times 10^7$ (-△-), $4,3 \times 10^5$ (-×-), $4,3 \times 10^3$ (-□-) UFC/mL, amostra controle (-○-) e limiar (-). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T obtidos por SYBR® Green qPCR em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de <i>Lb. plantarum</i>	64
Figura 5.3 - Curvas de <i>melting</i> para as diluições em série da cultura pura de <i>Lb. plantarum</i> (a) com uma T_M de $83,1 \pm 0,10$ °C e <i>W. viridescens</i> (b) com uma T_M de $81,4 \pm 0,04$ °C. A linha vertical preta represente a T_M média de cada cultura pura. A curva tracejada em vermelho representa o controle negativo.	66
Figura 5.4 - Quantificação de (a) <i>W. viridescens</i> e de (b) <i>Lb. plantarum</i> , ambas em cultura pura quantificadas por SYBR® Green qPCR e CP. A exatidão relativa (—) foi expressa como uma porcentagem das contagens em \log_{10} por SYBR® Green qPCR <i>versus</i> CP.	69
Figura 5.5 - Análise de regressão linear dos valores \log_{10} UFC/mL obtidos pelo método CP e SYBR® Green qPCR para quantificação de (a) <i>W. viridescens</i> e (b) <i>Lb. plantarum</i> . Linhas pontilhadas azuis finas representam o intervalo de confiança de 95%, linhas pontilhadas vermelhas representam as bandas de predição de 95% e a equação linear da linha de tendência é representada pela linha contínua espessa.	70
Figura 5.6 - Análise de concordância dos valores de \log_{10} UFC/mL observados por CP e por SYBR® Green qPCR para (a) <i>W. viridescens</i> e (b) <i>Lb. plantarum</i> usando análise de Bland-Altman. A linha contínua em negrito representa o Bias (média), enquanto os desvios-padrão da diferença média de \log_{10} são representadas como linhas tracejadas. A linha fina contínua representa a linha zero. DP, desvio-padrão.	71
Figura 5.7 - Curvas de crescimento das culturas pura e mista de <i>W. viridescens</i> e de <i>Lb. plantarum</i> obtidas por SYBR® Green qPCR. (a) comparação das curvas de <i>W. viridescens</i> e <i>Lb. plantarum</i> em cultivo misto. (b) comparação das curvas de <i>W. viridescens</i> em cultura pura e mista. (c) comparação das curvas de <i>Lb. plantarum</i> em cultura pura e mista.	72

Figura 6.1 – (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo na temperatura de 4 °C e (b) curva de <i>melting</i> para as diluições em série do coquetel de <i>W. viridescens</i> , com uma T_M de $79,69 \pm 0,05$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.	80
Figura 6.2 - (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo na temperatura de 8 °C e (b) curva de <i>melting</i> para as diluições em série do coquetel de <i>W. viridescens</i> , com uma T_M de $79,37 \pm 0,09$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.	80
Figura 6.3 - (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo na temperatura de 14 °C e (b) curva de <i>melting</i> para as diluições em série do coquetel de <i>W. viridescens</i> , com uma T_M de $79,66 \pm 0,09$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.	81
Figura 6.4 - (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo na temperatura de 30 °C e (b) curva de <i>melting</i> para as diluições em série do coquetel de <i>W. viridescens</i> , com uma T_M de $79,18 \pm 0,06$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.	81
Figura 6.5 - Análise de regressão linear dos valores de \log_{10} UFC/mL observados por CP e por SYBR® Green qPCR nas temperaturas de (a) 4 °C, (b) 8 °C, (c) 14 °C e (d) 30 °C. Correlação entre CP e SYBR® Green qPCR para quantificação de um coquetel de <i>W. viridescens</i> . Linhas pontilhadas vermelhas finas representam o intervalo de confiança de 95%, linhas pontilhadas azuis representam as bandas de predição de 95% e a equação linear da linha de tendência é representada pela linha contínua espessa.	88
Figura 6.6 - Análise de concordância dos valores de \log_{10} UFC/mL observados por CP e por SYBR® Green qPCR nas temperaturas de (a) 4 °C, (b) 8 °C, (c) 14 °C e (d) 30 °C. Concordância entre os métodos CP e SYBR® Green qPCR para quantificação de <i>W. viridescens</i> usando análise de Bland-Altman. A linha contínua em negrito representa o Bias (média), enquanto os desvios-padrão da diferença média de \log_{10} são representadas como linhas tracejadas. A linha fina continua representa a linha zero. DP, desvio-padrão.	90
Figura 6.7 – Quantificação de <i>W. viridescens</i> e de <i>L. mesenteroides</i> na cultura mista por SYBR® Green qPCR a 8 °C.	95

Figura 7.1 - Curvas de crescimento de *W. viridescens* em diferentes temperaturas e os ajustes dos modelos de (a) GOM (–) e de LMZ (--) e (b) de BAR (··). Em ambas as figuras, os dados experimentais foram obtidos pelos métodos de SYBR® Green qPCR (símbolos preenchidos) e CP (símbolos vazados) nas temperaturas de 4 °C (♦ ou ◇), 8 °C (● ou ○), 14 °C (■ ou □) e 30 °C (▲ ou ▴). As barras de erro representam o desvio-padrão. 104

Figura 7.2 - Ajustes dos modelos secundários aos dados do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidos pelo modelo primário de (a) BAR, (b) GOM e (c) LMZ. Os dados experimentais foram obtidos pelos métodos

SYBR® Green qPCR (■ ou ◆) e CP (□ ou ◇). Em todos os dois gráficos, a linha tracejada representa o ajuste do modelo secundário da raiz quadrada de Ratkowsky e as linhas contínuas representam o ajuste do modelo secundário exponencial.	111
Figura 7.3 - Curvas de crescimento da CTB (determinada por CP), <i>W. viridescens</i> (WV) e <i>L. mesenteroides</i> (LM) em cultura mista, determinadas por SYBR® Green qPCR a 8 °C (± 0,2 °C) de incubação e os ajustes dos modelos de BAR (dados do eixo primário), de GOM e LMZ (dados do eixo secundário). As barras de erro representam o desvio-padrão.	112
Figura 7.4 - Curvas de crescimento de <i>W. viridescens</i> (WV) diferenciada na cultura mista e em cultura pura, ambas determinadas por SYBR® Green qPCR a 8 °C (± 0,2 °C) de incubação e os ajustes dos modelos de BAR (dados do eixo primário), de GOM e LMZ (dados do eixo secundário). As barras de erro representam o desvio-padrão.	115
Figura 7.5 - Curvas de crescimento de <i>L. mesenteroides</i> (LM) diferenciada na cultura mista e em cultura pura, ambas determinadas por SYBR® Green qPCR a 8 °C (± 0,2 °C) de incubação e os ajustes dos modelos de BAR (dados do eixo primário), de GOM e LMZ (dados do eixo secundário). As barras de erro representam o desvio-padrão.	115

Figura 8.1 - Gráficos representativos de amplificação e curva-padrão. a) Aumento da fluorescência (ΔR_n) em relação ao número de ciclos de TaqMan™ qPCR para diluições em séries de um coquetel de WV correspondente a $4,3 \times 10^8$ (-■-), $4,3 \times 10^7$ (-□-), $4,3 \times 10^6$ (-▲-), $4,3 \times 10^5$ (-Δ-), $4,3 \times 10^4$ (-●-), $4,3 \times 10^3$ (-○-), $4,3 \times 10^2$ (-◆-), $4,3 \times 10^1$ (-◇-) CFU/g, amostra controle (-) e limiar (-x-). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T para seis execuções de TaqMan™ qPCR em duas amplificações independentes em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de WV. As barras de erro representam o desvio-padrão.

Figura 8.2 - Gráficos representativos de amplificação e curva-padrão. (a) Aumento da fluorescência (ΔR_n) em função do número de ciclos de TaqMan™ qPCR para diluições em séries de um coquetel de LM correspondente a $1,3 \times 10^8$ (-■-), $1,3 \times 10^7$ (-□-), $1,3 \times 10^6$ (-▲-), $1,3 \times 10^5$ (-Δ-), $1,3 \times 10^4$ (-●-), $1,3 \times 10^3$ (-○-), $1,3 \times 10^2$ (-◆-) UFC/g, amostra controle (-) e limiar (-x-). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T para seis execuções de TaqMan™ qPCR para duas amplificações independentes em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de LM. As barras de erro representam o desvio-padrão.

Figura 8.3 - Análise de regressão linear dos valores de \log_{10} UFC/g obtidos por CP e TaqMan™ qPCR. (a) Correlação entre CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de *Weissella viridescens* (WV) em amostras de MEV artificialmente contaminadas. (b) Correlação entre CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de *Leuconostoc mesenteroides* (LM) em amostras de MEV artificialmente contaminadas. Linhas tracejadas em todos os dois gráficos representam o intervalo de confiança e a equação linear da linha de tendência é representada pela linha contínua em negrito. R^2 , coeficientes de determinação.

Figura 8.4 - Avaliação da concordância entre os métodos CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de *Weissella viridescens* (WV) e *Leuconostoc mesenteroides* (LM), em amostras de MEV artificialmente contaminadas, usando análise de Bland-Altman. (a) Concordância entre CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de WV. Média de 0,59 (± 1,96 DP de -0,40 a 1,57 \log_{10}). (b) Concordância entre CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de LM. Média de 0,73 (± 1,96 DP

de -0,13 a 1,59 \log_{10}). A linha pontilhada fina representa a diferença zero, enquanto os desvios-padrão da diferença média de \log_{10} são representadas como linhas pontilhadas espaçadas e finas. DP, desvio-padrão. 136

Figura 8.5 - Curvas de crescimento de (a) *Weissella viridescens* (WV) e (b) *Leuconostoc mesenteroides* (LM) a 5 °C (■ ou □), 8 °C (● ou ○), 13 °C (▲ ou ▲) e 18 °C (◆ ou ◇) quantificados por métodos de CP (símbolos preenchidos) e TaqMan™ qPCR (símbolos vazados), e o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (BAR, linhas contínuas) aos dados experimentais obtidos em MEV. As barras de erro representam o desvio-padrão..... 137

Figura 8.6 - Ajuste dos modelos secundários aos dados do parâmetro $\mu_{máx}$ de (a) *Leuconostoc mesenteroides* (LM) e (b) *Weissella viridescens* (WV) em MEV obtidos pelos métodos TaqMan™ qPCR (símbolos preenchidos) e CP (símbolos vazados). Em todos os dois gráficos, a linha tracejada representa o ajuste do modelo secundário da raiz quadrada de Ratkowsky (■ ou □) e as linhas contínuas representam o ajuste do modelo secundário exponencial (◆ ou ◇)..... 142

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 - Espécies identificadas dentro do gênero <i>Weissella</i>	34
Quadro 4.2 - Espécies identificadas dentro do gênero <i>Leuconostoc</i>	36
Quadro 4.3 - Espécies identificadas dentro do grupo <i>Lactobacillus plantarum</i>	36
Quadro 4.4 - Bactérias ácido-láticas estudadas em diferentes tipos de produtos cárneos por meio da modelagem preditiva.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Bactérias utilizadas para o teste de especificidades dos iniciadores.	54
Tabela 5.2 - Teste de especificidade para os pares de iniciadores <i>recN</i> utilizando DNA extraído de cepas de <i>W. viridescens</i> (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos). Os valores de C_T e T_M em negrito indicam os valores para o DNA alvo.	59
Tabela 5.3 - Teste de especificidade para os pares de iniciadores <i>recA</i> utilizando DNA extraído de <i>Lb. plantarum</i> (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos). Os valores de C_T e T_M em negrito indicam os valores para o DNA alvo.	60
Tabela 5.4 - Valores de T_M e C_T obtidos para a mistura do DNA alvo com o DNA não alvo. O controle positivo, sem DNA não alvo presente na reação, é indicado em barras cinzas para cada par de iniciadores.	61
Tabela 5.5 - Medidas de C_T das reações de SYBR® Green qPCR para as diluições decimais do DNA de <i>W. viridescens</i> , de <i>Lb. plantarum</i> e de <i>L. mesenteroides</i>	62
Tabela 5.6 - Valores do rendimento e qualidade do DNA (A_{260}/A_{280}) de <i>W. viridescens</i> e de <i>Lb. plantarum</i> em relação ao tempo de cultivo.	67
Tabela 6.1 - Cepas bacterianas usadas neste estudo.	74
Tabela 6.2 - Valores das concentrações (\log_{10} UFC/mL) do coquetel de <i>W. viridescens</i> cultivada a 4, 8, 14 e 30 °C obtidas por CP e SYBR® Green qPCR e sua exatidão relativa.	85
Tabela 6.3 - Teste de especificidade para os pares de iniciadores <i>SCAR</i> utilizando DNA extraído de cepas de <i>L. mesenteroides</i> (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos). Os valores de C_T e T_M em negrito indicam os valores para o DNA alvo.	92
Tabela 6.4 - Valores das concentrações (\log_{10} UFC/mL) do coquetel de <i>W. viridescens</i> e da espécie <i>L. mesenteroides</i> em cultura mista a 8 °C ($\pm 0,2$ °C) diferenciadas por SYBR® Green qPCR e suas respectivas temperaturas de <i>melting</i>	94
Tabela 7.1 - Subdivisão das cepas bacterianas baseada nos parâmetros de crescimento em três classes: D (“dominante”), S (“subdominante”) e I (“inibida”).	101
Tabela 7.2 - Parâmetros de crescimento ($\pm 95\%$ IC) estimados pelos modelos de BAR (h_0 fixo = 1,12 para os ajustes dos dados obtidos por CP e h_0 fixo = 2,33 para os ajustes dos dados obtidos por SYBR® Green qPCR), de GOM e de LMZ aos dados experimentais do coquetel de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo armazenados a 4, 8, 14 e 30 °C obtidos pelos métodos de CP e de SYBR® Green qPCR.	106
Tabela 7.3 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste dos modelos BAR, GOM e LMZ aos dados experimentais do coquetel de <i>W. viridescens</i> em meio de cultivo armazenados a 4, 8, 14 e 30 °C obtidos pelos métodos de CP e de SYBR® Green qPCR.	107
Tabela 7.4 – Equações dos modelos secundários Exponencial e Raiz quadrada de Ratkowsky para os valores do parâmetro $\mu_{máx}$ estimados pelos modelos primários BAR, GOM e LMZ e os índices estatísticos (R^2_{aj} e RMSE).	110
Tabela 7.5 - Parâmetros de crescimento ($\pm 95\%$ IC) estimados pelo ajuste dos modelos de BAR, de GOM e de LMZ aos dados da CTB (obtidos por CP), aos dados de <i>W. viridescens</i> e de	

<i>L. mesenteroides</i> em cultura mista, determinados por SYBR® Green qPCR, a 8 °C (± 0,2 °C) de incubação.	117_Toc17641301
Tabela 7.6 – Subdivisão das cepas baseada nos parâmetros de crescimento, estimados pelo ajuste do modelo de BAR em cultivo misto a 8 °C.	118
Tabela 7.7 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste dos modelos de BAR, de GOM e LMZ aos dados experimentais da CTB pelo método de CP, do coquetel de <i>W. viridescens</i> e da cultura de <i>L. mesenteroides</i> pelo método de SYBR® Green qPCR em cultivo misto armazenado a 8 °C (± 0,2 °C).....	119
Tabela 8.1 - Cepas bacterianas usadas neste estudo.	123
Tabela 8.2 - Iniciadores de oligonucleotídeos utilizados nas amplificações de TaqMan™ qPCR.	128
Tabela 8.3 - Resultados de quantificação obtidos pelo método TaqMan™ qPCR em MEV artificialmente inoculada com um coquetel de <i>Weissella viridescens</i> (WV) e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (LM).	133
Tabela 8.4 - Parâmetros de crescimento (± 95% IC) estimados pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (BAR) (segundo passo, fixo h_0) aos dados experimentais de <i>W. viridescens</i> (WV) e <i>L. mesenteroides</i> (LM) em MEV artificialmente inoculada a 5, 8, 13 e 18 °C obtidos pelos métodos de TaqMan™ qPCR e de CP.	139
Tabela 8.5 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (BAR) aos dados experimentais de <i>Weissella viridescens</i> (WV) e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (LM) em MEV artificialmente inoculadas a 5, 8, 13 e 18 °C obtidos pelos métodos de CP e de TaqMan™ qPCR.	141
Tabela 8.6 - Valores dos parâmetros estimados (± intervalo de confiança) (a , b , c e T_{min}) do ajuste dos modelos secundários Exponencial e Raiz quadrada de Ratkowsky para os valores do parâmetro $\mu_{máx}$ e os índices estatísticos (R^2_{aj} e RMSE).	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	amplitude da concentração do crescimento microbiano
a	parâmetro empírico do modelo exponencial
b	parâmetro empírico do modelo da raiz quadrada
BAL	bactérias ácido-láticas
BAR	modelo de Baranyi e Roberts
BHI	meio de cultura: <i>Brain-Heart Infusion</i>
BHQ	<i>Quenchers Black Hole</i>
c	parâmetro empírico do modelo da raiz quadrada
CP	contagem em placas
C_T	<i>cycle threshold</i>
CTB	contagem total de BAL
DP	desvio-padrão
F(t)	função de ajuste do modelo BAR
FAM	<i>fluorescein amidite</i>
F_B	fator <i>bias</i> ou fator de tendência
F_E	fator de exatidão
g	gramas
GOM	modelo de Gompertz Modificado
h₀	parâmetro relacionado ao estado fisiológico das células
LMZ	modelo Logístico Modificado por Zwietering
log₁₀	logaritmo na base 10
MB	<i>Morcilla</i> de Burgos embalada a vácuo
MDE	modelagem em duas etapas
MGB	<i>minor groove binder</i>
min	minutos
MPC	modelo preditivo convencional
MPM	modelo preditivo molecular
MRS	meio de cultura: <i>Man, Rogosa e Sharpe</i>
N	número de observações
P	número de parâmetros do modelo
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
R²	coeficiente de determinação
R_{aj}²	coeficiente de determinação ajustado
RMSE	raiz do erro quadrático médio
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
T	temperatura de armazenamento
T_M	Temperatura de <i>melting</i>
T_{min}	temperatura mínima de crescimento teórica
UFC	unidades formadoras de colônias
\bar{y}	valores médios
y(t)	logaritmo da concentração microbiana

$Y(t)$	razão logarítmica entre as concentrações microbianas
y_0	logaritmo da concentração microbiana inicial
$y_{máx}$	logaritmo da população máxima
y_{obs}	valores observados
y_{pred}	valores preditos
λ	duração da fase de adaptação
$\mu_{máx}$	velocidade máxima específica de crescimento

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	26
1.1	HISTÓRICO DO LABORATÓRIO	27
2.	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3.	DIAGRAMA CONCEITUAL DA TESE	31
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
4.1	BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS	32
4.1.1	Gêneros <i>Weissella</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp.	33
4.1.2	A espécie <i>Weissella viridescens</i>	36
4.1.3	A espécie <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	38
4.1.4	A espécie <i>Lactobacillus plantarum</i>	38
4.1.5	Espécies deteriorantes de <i>morcilla</i>	39
4.2	MICROBIOLOGIA PREDITIVA	39
4.2.1	Aplicação da microbiologia preditiva na deterioração de produtos cárneos.....	40
4.3	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE BAL	42
4.4	MÉTODO DE PCR QUANTITATIVO (qPCR).....	44
4.4.1	SYBR® Green qPCR	46
4.4.2	TaqMan™ qPCR	47
4.5	DESCRIÇÃO DAS SEÇÕES	49
5.	DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROTOCOLO DE SYBR® Green qPCR PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE <i>Weissella viridescens</i> E <i>Lactobacillus plantarum</i>	50
5.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.1.1	Microrganismos	50
5.1.2	Cultivo do pré-inóculo.....	50
5.1.3	Preparo e condições dos cultivos	51
5.1.4	Elaboração das curvas de crescimento	51
5.1.4.1	Medição da Turbidez e pH	51
5.1.4.2	Método de contagem em placa (CP)	52
5.1.4.3	Método de SYBR® Green qPCR	52
5.1.5	Análise comparativa entre os métodos	56
5.1.6	Exatidão relativa entre CP e SYBR® Green qPCR.....	56
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.2.1	Seleção e especificidade dos iniciadores	57
5.2.2	Validação do ensaio SYBR® Green qPCR	62

5.2.3	Comparação entre CP e SYBR® Green qPCR para quantificação das cinéticas de crescimento.....	66
5.2.3.1	Rendimento e qualidade do DNA	66
5.2.3.2	Estabelecimento das cinéticas de crescimento em cultura pura	67
5.2.3.3	Estabelecimento das curvas de crescimento em cultura mista	71
5.3	CONCLUSÕES.....	73
6.	USO DOS MÉTODOS DE SYBR® Green qPCR E DE CONTAGEM EM PLACAS PARA CONSTRUÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>Weissella viridescens</i> E DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> EM CULTURAS PURAS E MISTA	74
6.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
6.1.1	Microrganismos	74
6.1.2	Cultivo do pré-inóculo.....	75
6.1.3	Preparo e condições dos cultivos.....	75
6.1.3.1	Cultura pura	75
6.1.3.2	Cultura mista	76
6.1.4	Elaboração das curvas de crescimento.....	76
6.1.4.1	Método de CP	76
6.1.4.2	Método de SYBR® Green qPCR	77
6.1.5	Análise comparativa dos métodos.....	79
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
6.2.1	Curvas-padrão de SYBR® Green qPCR	79
6.2.2	Quantificação de <i>W. viridescens</i> por SYBR® Green qPCR e por CP em cultura pura	83
6.2.2.1	Correlação e concordância entre os métodos	87
6.2.3	Quantificação do crescimento <i>W. viridescens</i> e <i>L. mesenteroides</i> por SYBR® Green qPCR e por CP em cultura mista.....	90
6.3	CONCLUSÕES.....	96
7.	ESTABELECIMENTO DE MODELOS PREDITIVOS MOLECULARES PARA DESCREVER O CRESCIMENTO DE <i>Weissella viridescens</i> E DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> EM CULTURAS PURAS E MISTA	98
7.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	98
7.2.1	Modelagem preditiva	98
7.2.1.1	Modelagem primária	98
7.2.1.2	Modelagem secundária.....	99
7.2.2	Análise numérica	100
7.2.3	Avaliação do desempenho dos modelos	101
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
7.3.1	Modelagem primária de <i>W. viridescens</i> por CP e SYBR® Green qPCR.....	102
7.3.2	Desempenho dos modelos primários convencionais e moleculares.....	106
7.3.3	Modelagem secundária de <i>W. viridescens</i> usando os métodos de CP e de SYBR® Green qPCR	108

7.3.4	Modelos moleculares para descrever o crescimento de <i>W. viridescens</i> e <i>L. mesenteroides</i> em cultura mista.....	111
7.4	CONCLUSÕES.....	120
8.	USO COMBINADO DOS MÉTODOS DE TaqMan™ qPCR E CONTAGEM EM PLACAS PARA PREDIZER O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EM PRODUTO CÁRNEO EMBALADO A VÁCUO....	122
8.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	122
8.1.1	Microrganismos.....	122
8.1.2	Preparo dos inóculos.....	123
8.1.3	Preparação das amostras de MB artificialmente inoculadas.....	123
8.1.4	Condições de armazenamento e medidas de crescimento.....	124
8.1.5	Quantificação de <i>LM</i> ou <i>WV</i>	124
8.1.5.1	Quantificação pelo método de CP.....	125
8.1.5.2	Quantificação pelo método de qPCR.....	125
8.1.6	Análise estatística comparativa dos métodos.....	129
8.1.7	Modelagem preditiva.....	129
8.1.7.1	Modelagem primária.....	129
8.1.7.2	Modelagem secundária.....	130
8.1.7.3	Análises numéricas.....	130
8.1.7.4	Avaliação do desempenho dos modelos.....	130
8.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	130
8.2.1	Curvas-padrão para MB.....	130
8.2.2	Comparação entre dados de crescimento obtidos pelos métodos TaqMan™ qPCR e CP	134
8.2.3	Modelagem primária de <i>LM</i> e <i>WV</i> em MB por CP e por TaqMan™ qPCR....	136
8.2.4	Avaliação do modelo primário de BAR ajustado aos dados de <i>LM</i> e <i>WV</i> em MB140	
8.2.5	Modelagem secundária de <i>LM</i> e <i>WV</i> em MB por CP e por TaqMan™ qPCR	141
8.3	CONCLUSÕES.....	145
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	146
10.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	148
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
	APÊNDICE A - Curvas de <i>melting</i> para as quantificações do DNA de (a) <i>W. viridescens</i> e correspondente e (b) <i>L. plantarum</i> . A linha tracejada representa o controle negativo (--) realizados em triplicata.....	173
	APÊNDICE B - Comparação da quantificação de <i>W. viridescens</i> e <i>L. plantarum</i> por CP e SYBR® Green qPCR.....	174
	APÊNDICE C - Valores do rendimento e qualidade do DNA da cultura mista, valores de C _T e T _M obtidos para cada BAL por SYBR® Green qPCR em reações independentes.....	175

APÊNDICE D - Perfis de pH da cultura pura de <i>W. viridescens</i> (■), <i>L. plantarum</i> (□) e cultura mista (●) em função do (a) tempo de cultivo e (b) \log_{10} UFC/mL das contagens obtidas por CP. As linhas contínuas representam a ligação entre os pontos experimentais, para facilitar a visualização dos dados. A linha tracejada representa a concentração $7 \log_{10}$ UFC/mL	176
ANEXO I – Composição dos meios de cultura utilizados na tese.	177
ANEXO II – Comprovante de submissão do artigo da Seção 8.	178

1. INTRODUÇÃO

A deterioração da carne e de produtos cárneos durante o processamento, a distribuição, o armazenamento e a venda para o consumidor é um problema de relevância social e econômica, que resulta em grandes prejuízos às indústrias alimentícias. A vida útil desses produtos, especialmente quando embalados a vácuo e refrigerados, está estritamente relacionada com o número e tipo de microrganismos, na sua maioria, bactérias ácido-láticas (BAL) inicialmente presentes. A capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dessas bactérias depende tanto das características dos alimentos quanto das condições ambientais (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; FRANCO; LANDGRAF, 2008; NYCHAS et al., 2008).

As BAL representam um grupo microbiano associado com a deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (KORKEALA; BJÖRKROTH, 1997). Vários autores têm relatado que as espécies *Weissella viridescens*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* são as BAL predominantes na microbiota natural de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo e armazenados sob temperaturas de refrigeração (SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000a,b; CHENOLL et al., 2007).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta essencial e básica para modelar o crescimento bacteriano e estimar o comportamento microbiano em alimentos para garantir a segurança e a qualidade dos produtos (McMEEKIN; ROSS, 1996; McMEEKIN et al., 1997; LONGHI et al., 2013). A maioria dos estudos publicados com a abordagem de modelagem preditiva utiliza métodos convencionais de contagem, que são considerados o padrão-ouro para detecção e identificação bacteriana (MANICHANH, 2011; LUNGU et al., 2012; LAUPLAND; VALIQUETTE, 2013; LIANG; PARK; YOON, 2016). Contudo, esses métodos convencionais exigem considerável consumo de tempo e trabalho intensivo e não são adequados para testes de rotina de grandes números de amostras (UYTTENDAELE; VANWILDEMEERSCH; DEBEVERE, 2003; KAWASAKI et al., 2005; JUNEJA et al., 2007; LUNGU et al., 2012; McKEE; COBB; PADILLA, 2012; AHMED et al., 2014). Além disso, tem sido repetidamente demonstrado que, com esses métodos, não é possível a caracterização microbiana completa de uma matriz alimentar (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Para simular as condições reais que ocorrem nos produtos cárneos deteriorados, surge a necessidade de estudar as curvas de crescimento em cultura mista, contendo diferentes espécies de BAL deteriorantes. A maioria dos trabalhos presentes na literatura estudam a modelagem matemática de diversos tipos de microrganismos em cultura pura, e muitas vezes, as interações ocorridas entre os microrganismos da microbiota natural de cada alimento (cultura mista) não são levadas em consideração (JANSSEN et al., 2006).

Muitos tipos de abordagens moleculares, principalmente o método de qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa, em inglês: *quantitative Polymerase Chain Reaction*), têm sido utilizados em combinação com métodos convencionais de cultura para a rápida detecção e quantificação de microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos (KAWASAKI et al., 2014; LUEDTKE; BOSILEVAC, 2015; KIM et al., 2017; PAPIĆ et al., 2017). Além disso, esse método molecular tem demonstrado grande potencial devido a sua elevada especificidade e sensibilidade (NOGVA et al., 2000; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2004) na identificação e quantificação de bactérias deteriorantes em nível de gênero ou espécie em várias matrizes alimentares (ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008; ACHILLEOS; BERTHIER, 2013). Até agora, não há relatos na literatura sobre o estabelecimento e aplicação de modelos preditivos de crescimento de BAL deteriorantes, utilizando um método molecular como novo padrão, para predição precisa da vida útil de produtos cárneos.

1.1 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO

Os Laboratórios Integrados de Engenharia Biológica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – LiEB/EQA/UFSC desenvolvem pesquisas na área de Microbiologia Preditiva desde 2003, sob a supervisão da Prof.^a Dr.^a Gláucia Maria Falcão de Aragão. Esta linha de pesquisa contribui para a formação de alunos de graduação e pós-graduação por meio do desenvolvimento de trabalhos de iniciação científica, dissertações e teses. No grupo, foram defendidas, até o momento da publicação da presente tese, quinze dissertações de mestrado e dez teses de doutorado. Os projetos desenvolvidos englobam temas como a termorresistência de bactérias formadoras de esporos, crescimento e/ou inativação de fungos e o crescimento de BAL deteriorantes de produtos cárneos, como *L. sakei*, *L. plantarum*, *W. viridescens* e *L. mesenteroides*.

As BAL são importantes no estudo da deterioração de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo. Devido a isso, no nosso grupo, diversos modelos preditivos foram aplicados com o objetivo de descrever o comportamento dessas bactérias. Dalcanton et al. (2013) modelaram o crescimento de *L. plantarum* em *chopped* suíno fatiado e embalado a vácuo, em condições isotérmicas. Silva et al. (2017) validaram um modelo preditivo para prever o crescimento de *W. viridescens* em presunto comercial fatiado embalado a vácuo, sob condições não isotérmicas e Paganini (2017) modelou o efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de orégano no crescimento de *W. viridescens* em presunto embalado a vácuo.

O estudo da microbiota natural de BAL deteriorantes tem fundamental importância para a determinação da vida útil de produtos cárneos. Por isso, vários trabalhos do nosso grupo têm utilizado modelos matemáticos para descrever o crescimento da microbiota natural de BAL nesses produtos, como em presunto (SLONGO et al., 2009), linguiça frescal de frango, sob diferentes concentrações de lactato de sódio e cloreto de sódio (SILVA, 2013), filés de frango resfriados embalados a vácuo e atmosfera modificada e armazenados sob condições isotérmicas e não isotérmicas (MEZARROBA, 2014) e em presunto fatiado embalado a vácuo, em condições isotérmicas e não isotérmicas, com aplicação de óleo essencial de orégano (MENEZES, 2016). No entanto, as curvas de crescimento da contagem de BAL foram construídas por meio do método tradicional de contagem em placas (CP), sem diferenciação e quantificação de espécies pertencentes à microbiota natural. Com isso, ocorreu a necessidade de estudar os métodos moleculares para a modelagem do crescimento de BAL em culturas puras e mistas.

Desde 2016, foram realizadas uma tese de doutorado e uma dissertação de mestrado com o uso de métodos moleculares como uma nova abordagem em microbiologia preditiva. Em tese defendida por Camargo (2015), o método de SYBR[®] Green qPCR foi utilizado para identificação e quantificação de *L. sakei*, *L. plantarum* e *W. viridescens* em meio de cultivo. No entanto, os iniciadores selecionados da literatura não representaram a especificidade necessária para amplificação e construção de curvas-padrão dessas bactérias. Posteriormente, em dissertação desenvolvida por Severo (2018), o método de SYBR[®] Green qPCR foi utilizado para a construção de curvas de crescimento de *L. mesenteroides* em cultura pura e mista e modelagem preditiva. Este método mostrou-se eficiente para a quantificação de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em cultura mista, tendo em vista que o método convencional de CP não permite a diferenciação dessas BAL.

Com isso, nesta tese, os métodos de CP e qPCR (baseado em SYBR[®] Green e baseado em sonda TaqMan[™]) foram comparados para quantificação de BAL em cultivo puro e misto e em produto cárneo embalado a vácuo. Os dados quantitativos obtidos por esses métodos foram utilizados para o estabelecimento de modelos preditivos, visando descrever o crescimento de BAL em meio de cultivo e em produto cárneo armazenados sob diferentes condições isotérmicas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese de doutorado foi comparar os métodos de contagem em placas (CP) e qPCR para enumeração de bactérias ácido-lácticas deteriorantes em cultura pura e mista e estabelecer modelos preditivos moleculares e convencionais para descrever as cinéticas de crescimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um novo protocolo de qPCR baseado em SYBR[®] Green para identificação e quantificação específica de *Weissella viridescens* e de *Lactobacillus plantarum* em meio de cultivo;
- Obter curvas de crescimento da cultura pura de *W. viridescens* e da cultura mista com *Leuconostoc mesenteroides*, em condições isotérmicas de cultivo, e comparar estatisticamente os resultados obtidos pelos métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR;
- Estabelecer um modelo preditivo molecular para o crescimento da cultura pura de *W. viridescens* e da cultura mista com *L. mesenteroides*, em condições isotérmicas em meio de cultivo;
- Obter as curvas de crescimento de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* e inoculadas em *morcilla*, embalada a vácuo e armazenadas em condições isotérmicas, e comparar estatisticamente os resultados obtidos pelos métodos de CP e de TaqMan[™] qPCR;
- Modelar o crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* inoculadas em *morcilla* embalada a vácuo obtido pelos métodos de CP e de TaqMan[™] qPCR e armazenadas em condições isotérmicas.

3. DIAGRAMA CONCEITUAL DA TESE

ESTABELECIMENTO E COMPARAÇÃO DE MODELOS PREDITIVOS CONVENCIONAIS E MOLECULARES PARA DESCREVER O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS DETERIORANTES DE PRODUTOS CÁRNEOS



Por quê? Para quê?

- As BAL fazem parte de um grupo microbiano associado à deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo ou em atmosfera modificada e, para determinar o grau de deterioração destes produtos, os métodos convencionais de cultura exigem considerável consumo de tempo, trabalho intensivo e não permitem diferenciar colônias morfológicamente semelhantes em uma microbiota natural;
- A aplicação do método de qPCR combinado com modelos preditivos pode apresentar uma excelente alternativa para descrever o crescimento de BAL deteriorantes, o que permitiria uma predição precisa da vida útil das diferentes espécies presentes em cultura mista.



O que já foi feito?

- Modelos preditivos foram desenvolvidos para descrever o crescimento de bactérias patogênicas em produtos cárneos, utilizando o método de qPCR para obtenção dos dados de crescimento;
- Não há relatos na literatura sobre o estabelecimento e aplicação de modelos preditivos de crescimento de BAL em produtos cárneos, utilizando o método de qPCR como novo padrão, para predição da vida útil desses produtos.



Hipóteses do trabalho

- Um modelo preditivo molecular, utilizando o método de qPCR, seria capaz de diferenciar e descrever a cinética de crescimento das principais BAL deteriorantes e predizer a vida útil de produtos cárneos.



Metodologia experimental

- Desenvolver um novo protocolo de SYBR[®] Green qPCR para identificar e construir curvas de crescimento de BAL em cultura pura e mista;
- Estabelecer modelos preditivos convencionais e moleculares do crescimento de *W. viridescens* em cultura pura e em cultura mista com *L. mesenteroides*, pelos métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR;
- Estabelecer modelos preditivos convencionais e moleculares do crescimento de *W. viridescens* e *L. mesenteroides* inoculadas em *morcilla* embalada a vácuo e armazenada em diferentes condições isotérmicas, pelos métodos de CP e de TaqMan[™] qPCR.



Respostas

- Modelos preditivos convencionais e moleculares para descrever o crescimento de BAL deteriorantes, em meio de cultivo e em produto cárneo, em diferentes condições isotérmicas de cultivo.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

As bactérias ácido-láticas (BAL) são um grupo de bactérias Gram-positivas (HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004), anaeróbias facultativas, microaerófilas, com morfologia de cocos ou bacilos não esporulados, imóveis e catalase negativa. Obtêm sua energia pela fermentação da glicose, produzindo ácido lático como maior produto da fermentação (MASSAGUER, 2006; EVANGELISTA, 2008; GEITENES et al., 2013).

Este grupo é composto por quinze gêneros pertencentes ao filo *Firmicutes*: *Aerocococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (JAY, 2005; MAYO; SINDEREN; VENTURA, 2008).

As BAL têm sido utilizadas na produção de alimentos fermentados e bebidas por séculos, contribuindo para o sabor, a segurança microbiana, aumento da vida útil, melhoria da textura e o perfil sensorial dos produtos (AXELSSON; AHRNÉ, 2000; LEROY; DE VUYST, 2004). Essas bactérias têm recebido atenção considerável por controlar perigos microbiológicos e desenvolver novas ferramentas para biopreservação (SCANNELL et al., 2000; LÉONARD et al., 2014). Muitas dessas são capazes de produzir bacteriocinas com atividade antagonista específica contra determinado grupo de bactérias ou a diferentes espécies (NES; JOHNSBORG, 2004).

Mesmo que apresentem a capacidade de produzir ácidos e bacteriocinas, as BAL podem determinar a deterioração precoce dos alimentos, classificando-as também como um grupo microbiano associado à deterioração de produtos cárneos, processados, curados, embalados a vácuo ou sob atmosfera modificada e armazenados sob temperaturas de refrigeração (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000a; CHENOLL et al., 2007).

As BAL deteriorantes podem causar efeitos indesejados, como sabores estranhos, descoloração, produção de gás, odor ácido, diminuição do pH, a produção de exsudato branco e a produção de limo (DAINTY; MACKEY, 1992; BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996;

KORKEALA; BJORKROTH, 1997; EGAN; SHAY; ROGERS, 1998; SAMELIS et al., 1998; SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000a,b; AUDENAERT, et al., 2010; SANTOS et al., 2003). Isso reduz a vida útil desses produtos e, conseqüentemente, leva ao desperdício de alimentos e a perdas econômicas significativas para as indústrias. Assim, é relevante avaliar o comportamento das BAL durante a vida útil de produtos cárneos cozidos e embalados a vácuo.

A velocidade com que os efeitos indesejáveis ocorrem é dependente de uma combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos, como a composição do produto, o método de embalagem e, principalmente, a temperatura de armazenamento (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996). Várias publicações relataram a identificação de BAL na microbiota natural de carne fresca e produtos cárneos, e as espécies frequentemente isoladas são *L. sakei*, *L. plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *L. mesenteroides* e *W. viridescens* (BORCH et al., 1988; ROVIRA et al., 1997; PARENTE; GRIECO; CRUDELE, 2001; MARTÍN et al., 2006; DIEZ et al., 2009a).

4.1.1 Gêneros *Weissella* spp., *Leuconostoc* spp. e *Lactobacillus* spp.

Filogeneticamente, os gêneros *Weissella* e *Leuconostoc* pertencem ao reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Leuconostocaceae*. Ambos os gêneros são Gram-positivos, catalase e oxidase negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos (BJÖRKROTH; HOLZAPPEL, 2006). O gênero *Lactobacillus* pertence ao reino *Bacteria*, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004).

O gênero *Weissella* e o gênero *Leuconostoc* estão intimamente relacionados entre si, assim como os gêneros *Fructobacillus* e *Oenococcus*. Originalmente, todos estes gêneros se incluíam no grupo denominado *Leuconostoc*. Mediante as análises dos genes *16S* e *23S rRNA*, diversos autores como Martínez-Murcia e Collins (1990) e Martínez-Murcia, Harland e Collins (1993) revelaram que o grupo *Leuconostoc* se dividia em três linhagens: *Leuconostoc sensu stricto*, *Leuconostoc paramesenteroides* e *Leuconostoc oenus*. Porém, foi Collins et al. (1993) que classificaram o gênero *L. paramesenteroides* e espécies atípicas de *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus confuses*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* e *Lactobacillus viridescens*) em um novo gênero denominado *Weissella*. Da mesma forma, Dicks, Dellaglio e

Collins (1995) reclassificaram a *L. oenus* dentro do gênero *Oenococcus oeni* e, mais tarde, Endo e Okada (2008) incluíram as espécies *Leuconostoc durionis*, *Leuconostoc ficulneum*, *Leuconostoc fructosum* e *Leuconostoc pseudoficulneum* no novo gênero *Fructobacillus*. Posteriormente, estudos filogenéticos demonstraram que os gêneros *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* e *Fructobacillus* se encontram completamente definidos (CHELO; ZÉ-ZÉ; TENREIRO, 2007, 2010).

O gênero *Weissella* está formado por 19 espécies (Quadro 4.1) (FUSCO et al., 2015). A morfologia das espécies deste gênero varia de células esféricas ou lenticulares a bastões irregulares, são não-formadoras de esporos, Gram-positivas, catalase-negativas, obrigatoriamente heterofermentativas e anaeróbicas facultativas. A principal rota metabólica das bactérias ácido-láticas é a conversão fermentativa de açúcares presentes nas matérias-primas in natura em ácido láctico, peptídeos antimicrobianos, exopolissacarídeos e uma variedade de outros metabólitos, colaborando no controle de outros microrganismos indesejáveis no meio, como leveduras (CROWLEY; MAHONY; VAN SINDEREN, 2012; LONGHI, 2016). Elas podem produzir isômeros de D (-) ou DL de ácido láctico como produtos de fermentação da glicose, variando sua capacidade de fermentar a arginina em função da espécie. Sua temperatura de crescimento varia entre 15 °C e 45 °C (BJÖRKROTH; DICKS; HOLZAPFEL, 2009) e pode crescer em temperaturas de refrigeração entre 4 °C e 8 °C (DALCANTON, 2010; CAMARGO, 2015; MARTINS, 2015).

Espécies de *Weissella* spp. podem existir em ambientes muito diversos. Elas são frequentemente isoladas de material vegetal, como legumes frescos, mandioca e silagem (WANG; NISHINNO 2008), grãos de cacau (De BRUYNE et al., 2008), assim como de carne e produtos cárneos (MILBOURNE 1983; COLLINS et al., 1993; HAN et al., 2010; PATTERSON et al., 2010; DOULGERAKI et al., 2012; KESMEN et al., 2012), de peixes (TANASUPAWAT, 2000; LIU et al. 2009), de Kimchii (CHOI et al., 2002; LEE et al., 2002), de especiarias da Malásia (BJÖRKROTH et al. 2002) e do solo (MAGNUSSON et al. 2002). *Weissella* spp. são geralmente consideradas não patogênicas (WALTER, 2001; BJÖRKROTH et al., 2002; LIU et al., 2009).

O gênero *Leuconostoc* está formado por 12 espécies (Quadro 4.2). Estas espécies apresentam uma morfologia variável que vai desde cocos a formas ovais que se apresentam em duplas ou em cadeias curtas, são imóveis, heterofermentativas, produtoras de D (-) ácido láctico na fermentação da glicose e incapazes de hidrolisar arginina. São bactérias mesófilas com uma temperatura ótima de crescimento entre 20 e 30 °C podendo crescer a uma temperatura mínima

para a maioria das espécies de 5 °C e com um pH ótimo de crescimento de 6,5 (HOLZAPFEL et al., 2009)

Quadro 4.1 - Espécies identificadas dentro do gênero *Weissella*.

Espécie	Origem	Referência
<i>W. beninenses</i>	Mandioca fermentada	Padonou et al. (2010)
<i>W. ceti</i>	Baleias-de-bico (<i>Ziphiidae</i>)	Vela et al. (2011)
<i>W. cibaria</i>	Produtos fermentados e amostras clínicas de humanos e animais	Björkroth et al. (2002)
<i>W. confusa</i>	Cana de açúcar	Holzapel e Kandler (1969)
<i>W. diestrammenae</i>	Intestino de grilos	Oh et al. (2013)
<i>W. fabalis</i>	Fermentação de grãos de cacau	Snauwaert et al. (2013)
<i>W. fabaria</i>	Fermentação do cacau de Gana	De Bruyne et al. (2010)
<i>W. ghanensis</i>	Fermentação do cacau de Gana	De Bruyne et al. (2008)
<i>W. halotolerans</i>	Salsichas	Kandler, Schillinger e Weiss (1983)
<i>W. hellenica</i>	Salsichas fermentadas	Collins et al. (1993)
<i>W. kandleri</i>	Deserto de Namíbia	Holzapel e Van Wyk (1982)
<i>W. koreensis</i>	Kimchi	Lee et al. (2002)
<i>W. minor</i>	Leite	Kandler, Schillinger e Weiss (1983)
<i>W. oryzae</i>	Arroz	Tohno et al. (2013)
<i>W. paramesenteroides</i>	Silagem	Garvie (1967)
<i>W. soli</i>	Terra	Magnusson et al. (2002)
<i>W. taj-apis</i>	Mel	Tajabadi et al. (2012)
<i>W. thailandensis</i>	Peixe fermentado (<i>pla-ra</i> e <i>pla-chom</i>)	Tanasupawat et al. (2000)
<i>W. viridescens</i>	Produtos cárneos curados	Niven e Evans (1957)

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Bactérias dos gêneros *Weissella* e *Leuconostoc* são encontradas associadas com uma ampla variedade de produtos à base de carne, incluindo a carne fresca embalada a vácuo, bem como os produtos cárneos processados e fermentados (HAN et al., 2010; DIEZ et al., 2009c).

Quadro 4.2 - Espécies identificadas dentro do gênero *Leuconostoc*.

Espécie	Origem	Referência
<i>L. carnosum</i>	Carne refrigerada	Shaw e Harding (1989)
<i>L. citreum</i>	Mel	Farrow, Facklam e Collins (1989)
<i>L. fallax</i>	Chucrute	Martínez-Murcia e Collins (1990)
<i>L. gelidum</i>	Carne refrigerada	Shaw e Harding (1989)
<i>L. holzapfelii</i>	Fermentação do café	De Bruyne et al. (2007)
<i>L. inhae</i>	Kimchi	Kim et al. (2003)
<i>L. kimchii</i>	Kimchi	Kim, Chun e Han (2000)
<i>L. lactis</i>	Leite	Garvie (1986)
<i>L. mesenteroides</i>	Solução de beterraba açucareira	Garvie (1986)
<i>L. miyukkimchii</i>	Algas (<i>Undaria pinnatifida</i>) kimchii	Lee et al. (2012)
<i>L. palmae</i>	Vinho de coco	Ehrmann, Freiding e Vogel (2009)
<i>L. pseudomesenteroides</i>	Suco de cana de açúcar	Farrow, Facklam e Collins (1989)

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O gênero *Lactobacillus* é representado por mais de 100 espécies e subespécies, ocupando diversos ambientes onde se encontram carboidratos fermentáveis, como vegetais, produtos lácteos fermentados e queijos (FELIS; DELLAGLIO, 2007). O grupo *L. plantarum* compreende 5 espécies (Quadro 4.3), das quais 2 espécies, *Lactobacillus fabifermentans* e *Lactobacillus xiangfangensis* foram descritas em 2009 e 2012, respectivamente. Esse grupo é muito homogêneo em termos de características metabólicas, uma vez que os membros são heterofermentativos facultativos.

Quadro 4.3 - Espécies identificadas dentro do grupo *Lactobacillus plantarum*.

Espécie	Origem	Referência
<i>L. pentosus</i>	Carne refrigerada	Zanoni et al. (1987)
<i>L. plantarum</i>	Saliva humana	Orla-Jensen (1919)
<i>L. paraplantarum</i>	Cerveja	Curk, Hubert e Bringel (1996)
<i>L. fabifermentans</i>	Cacau fermentado	Bruyne et al. (2009)
<i>L. xiangfangensis</i>	Picles	Gu et al. (2012a)

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

4.1.2 A espécie *Weissella viridescens*

O crescimento da espécie *W. viridescens* é fortemente influenciado pela temperatura de armazenamento, mesmo em condições de refrigeração (KOUTSOUMANIS et al., 2006; CAYRÉ; VIGNOLO; GARRO, 2007). Vários estudos relataram que a capacidade dessa espécie de resistir a tratamentos térmicos (com $D_{60\text{ }^{\circ}\text{C}} = 14,7$ min em mortadela de carne) e de alta pressão (400 a 600 MPa a 22 °C durante 10 min), e de crescer a temperaturas de refrigeração, favorece o crescimento em produtos cárneos, resultando, assim, na sua deterioração (COMI; IACUMIN, 2012; HAN et al., 2010, 2011; PEIRSON; GUAN; HOLLEY, 2003; SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000a; VRCHLABSKÝ; LEISTNER, 1971). Essa espécie foi isolada de carne moída, artificialmente inoculada e cozida durante 5 min a 80 °C (LÖRINCZ; INCZE, 1961). A resistência térmica relativamente alta dessa espécie resulta das boas capacidades adaptativas de *W. viridescens* para sobreviver ao tratamento térmico (BORCH; KANT-MUERMANS; BLIXT, 1996; MILBOURNE, 1983).

Numerosos estudos têm associado *W. viridescens* aos processos de deterioração de lombo suíno defumado e embalado a vácuo, bacon, mortadela, salsichas embaladas a vácuo sob-refrigeração (SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000a), salsicha de sangue típica da Espanha (*morcilla*) (KOORT et al, 2005; DIEZ et al., 2009b; GÓMEZ-ROJO et al., 2015), filés de peito de peru cozido embalado a vácuo (SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000b) e salsichas cozidas a vácuo (IACUMIN et al., 2014).

Uma pesquisa no banco de dados *Scopus* para "*Weissella viridescens*", realizada em 06 de setembro de 2019, revelou 96 artigos sobre esse microrganismo, destacando a presença de *W. viridescens* como deteriorante de produtos cárneos (COMI; IACUMIN, 2012; HAN et al., 2011; HU et al., 2009; SANTOS et al., 2005b) e o seu potencial como iniciador, probiótico ou produtor de bacteriocina (CASTILHO et al., 2019; SÁEZ; FLOMENBAUM; ZÁRATE, 2018; PAPAMANOLI et al., 2003).

Comi e Iacumin (2012) investigaram a deterioração em presuntos cozidos, causada pelo crescimento de *W. viridescens*. Esses presuntos deteriorados tinham um ligeiro sabor a vinagre porque as espécies do gênero *Weissella* produzem ácido acético durante a fermentação. Os mesmos autores também estudaram as propriedades fisiológicas de isolados de *W. viridescens* e avaliaram o crescimento de *Weissella* spp. em 6 e 8% de NaCl. O ambiente de NaCl a 6% não evitou o crescimento de *Weissella* spp. e 80% das cepas cresceram mesmo em 8% de NaCl. Comi e Iacumin

(2012) também observaram que *W. viridescens* foi capaz de crescer em temperaturas de refrigeração de 8, 6 e 4° C e com tempos de geração de 5, 12 e 20 h, respectivamente. Assim, o reconhecimento precoce de *W. viridescens* é uma questão fundamental para garantir a qualidade dos produtos cárneos.

4.1.3 A espécie *Leuconostoc mesenteroides*

A espécie *L. mesenteroides* está formada por 4 subespécies, que são *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *L. mesenteroides* subsp. *suionicum* (GARVIE, 1983; GU et al., 2012b). Essa espécie foi descrita por diversos autores como uma das principais BAL responsáveis pela deterioração de produtos cárneos cozidos e embalados a vácuo como presunto, peitos de pavão cozidos e curados, filés de pavão cozidos e *morcilla*, devido ao seu rápido crescimento e a sua capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração (SAMELIS; KAKOURI; REMENTZIS, 2000a,b; CHENOLL et al., 2007; DIEZ et al., 2009c; COMI; IACUMIN, 2012). Esses produtos devem ser mantidos em temperaturas de refrigeração e, geralmente, são embalados a vácuo ou em atmosfera modificada para estender sua vida útil, embora isso seja limitado a um máximo de algumas semanas (KAMENÍK et al., 2015).

4.1.4 A espécie *Lactobacillus plantarum*

A espécie *L. plantarum* é uma bactéria mesófila com a capacidade para crescer a temperaturas desde 4 °C até 45 °C, na presença de 4 a 6% de NaCl e em valores de pH entre 4 e 9 e pertence às espécies heterofermentativas facultativas capazes de fermentar pentoses (SOMBOON et al., 1992; SALMINEN; VON WRIGHT, 1993; DALCANTON, 2010; CAMARGO et al., 2018). Segundo Aymerich et al. (2003), *L. plantarum* é uma espécie frequentemente isolada de produtos cárneos fermentados. Chenoll et al. (2007) relataram que, em amostras de produtos cárneos cozidos, embalados a vácuo e armazenados por um tempo excepcionalmente longo (8 meses), *L. plantarum* tornou-se a espécie dominante.

4.1.5 Espécies deteriorantes de *morcilla*

As salsichas de sangue são produtos cárneos cozidos, populares e conhecidos em muitas partes do mundo como *morcilla* (CACHALDORA et al., 2013), *prieta* (GONZALEZ-SCHNAKE; NOVA, 2014), *morcela* de arroz (PEREIRA et al., 2015) e *sanganel* (IACUMIN et al., 2017). Esse típico produto cárneo cozido foi escolhido como representativo por conter uma matriz complexa, que o torna mais sensível à deterioração. Além disso, a *morcilla* de Burgos embalada a vácuo (MB), produzida no norte da Espanha, é uma das típicas salsichas de sangue mais estudadas quanto à deterioração e à microbiota (DIEZ et al., 2008a; 2009a, 2009b; KOORT et al., 2006; SANTOS et al., 2005a).

A população microbiana deteriorante de MB provavelmente inclui *W. cibaria*, *L. lactis*, *L. citreum*, *L. sakei*, e as espécies *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, que foram relatadas como as principais BAL responsáveis pela deterioração de MB (DIEZ et al., 2008b; 2009c; SANTOS et al., 2005b). Assim, a MB é um importante produto cárneo que pode ser utilizado para os testes de vida útil baseados no crescimento das espécies *L. mesenteroides* e *W. viridescens*.

4.2 MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva é uma ferramenta essencial para modelar o crescimento bacteriano e prever o comportamento microbiano em alimentos, garantindo a segurança e a qualidade dos produtos (McMEEKIN; ROSS, 1996). De acordo com Whiting e Buchanan (1993), a abordagem tradicional na modelagem preditiva segue um processo de duas etapas: modelagem primária e secundária.

Modelos primários representam a dinâmica das populações microbianas em função do tempo, sob condições ambientais e de cultivo constantes (McKELLAR; LU, 2004), como os modelos de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994), Logístico modificado por Zwietering et al. (1990) (KREYENSCHMIDT et al., 2010) e de Gompertz modificado (ZWIETERING et al., 1990). A estimativa dos parâmetros ajustáveis desses modelos (y_0 , λ , $\mu_{m\acute{a}x}$ e $y_{m\acute{a}x}$ ou A) pode ser realizada com diferentes abordagens (LONGHI, 2016).

Na modelagem secundária, um modelo apropriado é usado para descrever o efeito de mudanças ambientais, por exemplo, temperatura, nos parâmetros dos modelos primários (HUANG, 2017 e ROSS e DALGAARD, 2004).

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).

4.2.1 Aplicação da microbiologia preditiva na deterioração de produtos cárneos

A deterioração da carne e produtos cárneos embalados a vácuo, durante o processamento, distribuição, armazenamento e venda para o consumidor, é um assunto de grande interesse na literatura (NYCHAS et al., 2008). Esses produtos apresentam normalmente uma carga inicial de BAL em torno de 10 a 10^3 UFC/g (PARENTE; GRIECO; CRUDELE, 2001; KOUTSOUMANIS et al., 2006) e o limite crítico estabelecido para a deterioração é de 10^6 a 10^7 UFC/g (BERRUGA; VERGARA; LINARES, 2005; DJENANE et al., 2005; VERMEIREN et al., 2005; DIEZ et al., 2008a, 2009c; SLONGO et al., 2009; IRKIN et al., 2011).

A microbiologia preditiva é uma ferramenta importante para descrever o comportamento dos organismos deteriorantes, assim como a progressão dos processos de deterioração nos alimentos (McMEEKIN; ROSS, 1996). Modelos do tipo sigmoide, como o modelo de Baranyi e Roberts (BARANYI; ROBERTS, 1994), têm sido comumente usados como modelo primário a fim de ajustar-se aos dados de crescimento microbiano para determinar os parâmetros cinéticos, tais como a velocidade máxima específica de crescimento e a duração da fase de latência (lag) (DALCANTON et al., 2013; LONGHI et al., 2014; MENEZES et al., 2018).

A maioria dos modelos para a predição da vida útil desenvolvidos para produtos refrigerados descrevem o crescimento dos microrganismos específicos de deterioração em função da temperatura, porque esse é o fator de influência mais importante na vida útil (ZWIETERING et al., 1991; McMEEKIN; ROSS; OLLEY, 1992; LONGHI et al., 2013; TARLAK; OZDEMIR; MELIKOGLU, 2018). Esses modelos já foram utilizados para descrever o comportamento de BAL em diversos produtos cárnos, conforme apresentado no Quadro 4.4 abaixo.

Quadro 4.4 – Bactérias ácido-lácticas estudadas em diferentes tipos de produtos cárneos por meio da modelagem preditiva.

Microorganismo	Alimento	Referência
Microbiota natural de BAL	Presunto cozido, fatiado e embalado a vácuo	Menezes et al. (2018)
	Carne bovina crua embalada a vácuo	Li et al. (2013), Liu; Yang; Li (2013)
	Carne suína	Liu et al. (2006)
	Presunto tratado por alta pressão hidrostática	Slongo et al. (2009)
	Emulsões de carne cozidas, embaladas a vácuo	Cayré; Vignolo; Garro (2003)
	Salsichas irlandesas cozidas, embaladas a vácuo	Feng et al. (2014)
<i>L. plantarum</i>	Carne suína cozida, moído e embalado a vácuo	Dalcanton et al. (2013)
<i>L. mesenteroides</i>	Peito de frango, peito de peru e presunto	Zurera-Cosano et al. (2005, 2006)
<i>W. viridescens</i>	Presunto comercial fatiado e embalado a vácuo	Silva et al. (2017), Longhi et al. (2018)

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Embora a maioria dos dados brutos para modelagem preditiva tenha se originado de métodos microbiológicos tradicionais, a abordagem é demorada e trabalhosa. Além disso, esses métodos apresentam, ainda, baixa reprodutibilidade para diferenciar o crescimento de bactérias dominantes, subdominantes e inibidas presentes em uma matriz alimentar, como por exemplo a microbiota natural de produtos cárneos (CHENOLL et al., 2007).

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).

De acordo com McMeekin et al. (2008), microbiologistas preditivos serão confrontados com novos desafios experimentais, e informações fisiológicas e moleculares estarão cada vez mais disponíveis para incorporação em modelos.

4.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE BAL

Os métodos microbiológicos tradicionais dependentes de cultivo, utilizados para a detecção e a enumeração da presença de BAL, são baseados em plaqueamento em ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) de uma diluição adequada do alimento homogeneizado e em incubação do mesmo sob condições específicas de concentração, tempo e temperatura.

O método de plaqueamento para o isolamento de BAL tem certas limitações, como a baixa reprodutibilidade e, nem sempre, representa a composição microbiana da amostra, posto que ele não é capaz de detectar bactérias estressadas, fracas ou aquelas que introduzem um estado de viabilidade não cultivável (do inglês, *Viable But Non-Culturable*, VBNC). Vários fatores influenciam esse estado, como a disponibilidade de nutrientes, mudanças de pH, temperaturas baixas e tratamentos térmicos. Apesar de serem metabolicamente ativas, viáveis e capazes de produzir alterações sensoriais, bactérias sob essas condições não produzem colônias no meio de cultura proposto para o seu crescimento, seletivo ou não seletivo (FLEET, 1999; SCHILLINGER et al., 2006). Assim, após o cultivo das BAL, sua identificação é necessária por meio da aplicação de técnicas fenotípicas ou genotípicas (HAN et al., 2011).

Os métodos fenotípicos têm sido amplamente utilizados para a identificação de BAL. São fundamentados em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, tais como a morfologia das células, o crescimento a temperaturas diferentes, o modo de fermentação da glicose, a configuração de ácido láctico, a fermentação de vários carboidratos, de ésteres metílicos e de compostos nitrogenados, bem como a composição proteica e de ácidos graxos da parede celular ou da célula inteira. Essas técnicas são pouco reprodutíveis, ambíguas, com pouca resolução taxonômica, permitindo, em alguns casos, a diferenciação em relação ao gênero, porque eles simplesmente não são capazes de expressar toda a informação contida no genoma (MOHANIA et al., 2008; SAMELIS et al., 1998; SCHILLINGER et al., 2006; TEMMERMAN; HUYS; SWINGS,

2004). Como resultado, houve um aumento no uso de várias técnicas genotípicas para a identificação e a caracterização de BAL que geram uma classificação mais robusta e uma melhor diferenciação no âmbito de espécie dessas bactérias (TEMMERMAN et al., 2004).

Numerosas técnicas genotípicas foram utilizadas para identificar BAL e são baseadas no sequenciamento das regiões *16S* ou *23S rDNA* e as técnicas de *fingerprinting* (SCHILLINGER et al., 2006). Essas últimas englobam técnicas como a amplificação aleatória de DNA polimórfico (do inglês, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) (AYMERICH et al., 2006), a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (do inglês, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*, ARDRA) (BONOMO et al., 2008), a análise de polimorfismo de fragmento amplificado (do inglês, *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) (GIRAFFA; NEVIANI, 2000; POTHAKOS et al., 2014), a amplificação por PCR palindrômico extragênico repetitivo (do inglês, *Repetitive Extragenic Palindromic-PCR*, rep-PCR) (VASILOPOULOS et al., 2008), a ribotipagem (do inglês, *ribotyping*) (SANTOS et al., 2005b; VIHAVAINEN et al., 2007) e a eletroforese em gel de campo pulsado (do inglês, *Pulsed-field Gel Electrophoresis*, PFGE) (DOULGERAKI et al., 2010; DIEZ et al., 2008b; ERCOLINI et al., 2010), a eletroforese em gel de gradiente de temperatura (do inglês, *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*, TGGE) (COCOLIN et al., 2000), o pirosequenciamento (ERCOLINI et al., 2011), a hibridação *in situ* fluorescente (do inglês, *Fluorescent in situ Hybridization*, FISH) (ERCOLINI; HILL; DODD, 2003) e o sequenciamento em massa (do inglês, *High-Throughput Sequencing*, HTS) (ERCOLINI, 2013).

Os métodos moleculares apresentam muitas vantagens em relação aos métodos convencionais para identificação e quantificação de bactérias em alimentos. São mais rápidos, sensíveis e específicos e, ainda, permitem a detecção de populações dominantes e subdominantes em cultura mista (POSTOLLEC et al., 2011). Dentre esses métodos, o método de qPCR (do inglês: *quantitative Polymerase Chain Reaction*) tem demonstrado grande potencial devido a sua elevada especificidade e sensibilidade (NOGVA et al., 2000; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2004) na identificação e na quantificação de bactérias em vários alimentos (PAUL et al., 2015; MAKINO; FUJIMOTO; WATANABE, 2010; SAKAMOTO et al., 2011).

4.4 MÉTODO DE PCR QUANTITATIVO (qPCR)

O método de qPCR foi descrito, em 1993, por Higuchi e colaboradores (HIGUCHI et al., 1993) que, ao acoplarem 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 fita recém-sintetizadas. Além disso, o qPCR requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador, com sistema óptico para a excitação e captação da emissão da fluorescência e um computador com *software* próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (OLIVEIRA, 2009).

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; STRACHAN; READ, 2013).

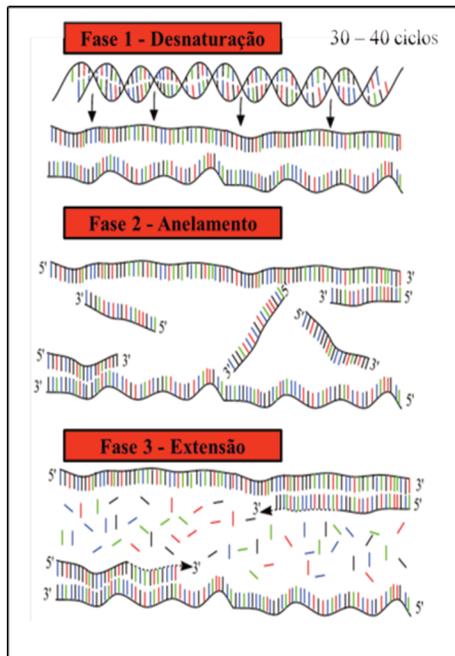
Existe um ponto na reação onde o nível de fluorescência atinge o limiar da fase exponencial, definido pelo *software* do qPCR. Esse ponto corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável, isto é, que cruze o limiar do ciclo de amplificação (do inglês, *cycle threshold*, C_T) (BUSTIN, 2000; NICKLAS; BUEL, 2003; KUBISTA et al., 2006).

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

As curvas de amplificação utilizando qPCR são divididas em três fases que dependem da variação de temperatura (Figura 4.1). Na primeira fase, ocorre a desnaturação da dupla hélice de DNA por aquecimento elevado entre 94 °C e 96 °C, originando duas fitas separadas. Em seguida, a temperatura é reduzida para o anelamento dos iniciadores (curta sequência de oligonucleotídeos) com as duas fitas de DNA separadas. A temperatura de anelamento depende da sequência dos iniciadores e da força iônica da solução (KUBISTA et al., 2006). Durante a fase de extensão, a

temperatura é elevada no intervalo de 72 °C a 76 °C, no qual as enzimas DNA polimerases (como por exemplo, a Taq DNA polimerase) tem a sua atividade máxima, permitindo a extensão dos iniciadores e uma nova fita de DNA será criada.

Figura 4.1- Diagrama esquemático das fases de um ciclo da técnica da PCR.



Fonte: adaptado de Vierstraete (1999)

A detecção da amplificação de qPCR é baseada no uso de corantes intercalantes (por exemplo, SYBR[®] Green) que se ligam à dupla fita de DNA ou com o uso de sondas de hidrólises específicas (por exemplo, TaqMan[™]) para uma região da molécula que está sendo amplificada, por meio da absorção e emissão de luz em um comprimento de onda específico (MACKAY et al., 2007; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Vários ensaios de qPCR já foram publicados para a detecção e a quantificação de BAL deteriorantes, como a contagem total de BAL em cerveja (HAAKENSEN et al., 2007), de *L. sakei* em carne e salsichas fermentadas (MARTÍN et al., 2006), de *L. mesenteroides* em carne de porco marinada da Espanha (ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008), de *W. viridescens* em *morcilla* (GÓMEZ-ROJO et al., 2015) e de *L. plantarum* deteriorante de vinhos (KÁNTOR et al., 2016). A maioria desses protocolos de quantificação de BAL utiliza sondas de hidrólises

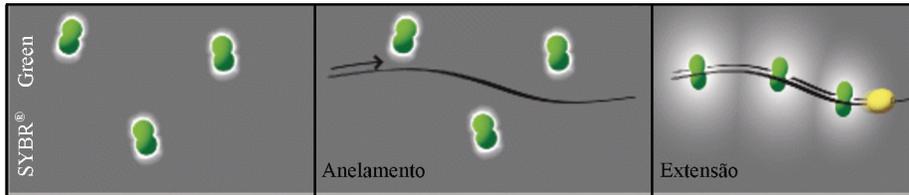
específicas (por exemplo, TaqMan™) para uma região da molécula que está sendo amplificada. No entanto, o corante SYBR® Green é predominantemente usado para a detecção e a quantificação de ácidos nucleicos, devido ao seu *design* simples, à fácil configuração e ao baixo custo, porque não há necessidade de desenhar e sintetizar uma sonda. Além disso, poucos desses protocolos consideram as interações microbianas ocorrentes durante a deterioração dos alimentos.

O qPCR tem sido usado para detectar e quantificar BAL em nível de gênero ou espécie, como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* em várias matrizes alimentares (ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008; ACHILLEOS; BERTHIER, 2013; LU et al., 2015). Apesar do potencial deste método, poucas pesquisas foram relatadas sobre o uso de qPCR para construir curvas de crescimento de *Weissella* spp. em produtos alimentícios. Gómez-Rojo et al. (2015) relataram o desenvolvimento de um novo procedimento de TaqMan™ qPCR baseado em uma sequência do gene *recN*, que pode ser usado para detectar e quantificar *W. viridescens* em matrizes de alimentos. Zhao et al. (2014) desenvolveram um método de SYBR® Green qPCR para a detecção de *Weissella* spp. em abóbora fermentada. Camargo (2015) aplicou modelos matemáticos para descrever o crescimento da cultura mista das BAL *L. sakei*, *L. plantarum* e *W. viridescens* obtido pelo método de CP e de SYBR® Green qPCR, no entanto, ambos os métodos não apresentaram a especificidade necessária para a diferenciação dessas bactérias.

4.4.1 SYBR® Green qPCR

Dentre as técnicas utilizadas em qPCR, o sistema SYBR® Green é um dos mais utilizados, pois ele apresenta vantagens como baixo custo, facilidade na utilização e alta sensibilidade de detecção (MACKAY et al., 2007). Em contrapartida, esse sistema apresenta como principal desvantagem a capacidade de gerar fluorescência na presença de qualquer dupla fita de DNA (Figura 4.2), sendo necessários testes adicionais, como a análise da curva de *melting* (curva de fusão) para confirmar a amplificação de um fragmento específico de acordo com o seu tamanho (BUSTIN, 2000; PAUDEL et al., 2011). O uso dessa análise elimina a necessidade de eletroforese em gel de agarose, pois a temperatura de *melting* (T_M) do fragmento específico é análoga à detecção de uma banda eletroforética (GIGLIO et al., 2003). A T_M é definida como a temperatura na qual 50% do fragmento de DNA está em uma configuração de dupla fita (RIRIE et al., 1997).

Figura 4.2 - Mecanismo de ação do corante intercalante SYBR® Green.



Fonte: adaptado de Gasparic et al. (2010)

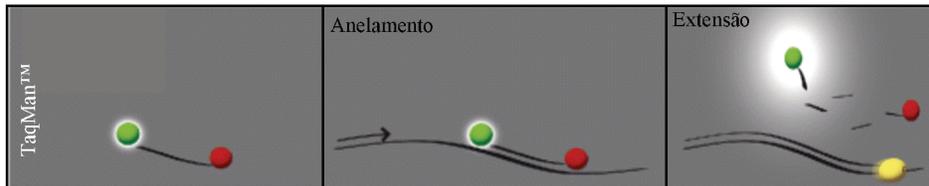
Os protocolos de qPCR baseados na tecnologia SYBR® Green têm sido cada vez mais utilizados para identificação e quantificação precisas e confiáveis de microrganismos, como BAL e bifidobactérias em leites fermentados (GARCÍA-CAYUELA et al., 2009), *Shigella* spp. em amostras de alimentos (MOKHTARI et al., 2013), *Escherichia coli* em carne (BRUSA et al., 2015), *L. plantarum* deteriorante de vinhos (KÁNTOR et al., 2016) e *Lactobacillus paracasei* em iogurte (ILHA et al., 2016). No entanto, com a necessidade crescente de estudos da interação de bactérias em uma microbiota natural, está se tornando mais importante detectar múltiplos alvos de interesse na mesma reação. Nesse caso, devem ser realizadas as reações de multiplexação, utilizando sondas marcadas com diferentes fluoróforos.

4.4.2 TaqMan™ qPCR

A amplificação dos produtos de qPCR por meio do sistema de sonda, como TaqMan™, utiliza a enzima DNA polimerase para produzir um sinal fluorescente. A sonda TaqMan™ é um oligonucleotídeo complementar ao fragmento que se deseja amplificar, marcado com um fluoróforo repórter na extremidade 5' e um *quencher* (supressor) na extremidade 3'. Na presença do DNA alvo, a sonda se liga na região interna aos iniciadores durante a etapa de anelamento, e os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'→3' da DNA polimerase (Figura 4.3) (RODRIGUEZ et al., 2005; ZHANG et al., 2007). A grande vantagem da sonda TaqMan™ é a multiplexação (qPCR multiplex), em que vários produtos são amplificados na mesma reação e detectados em paralelo (KUBISTA et al., 2006), além da elevada sensibilidade, especificidade e menor risco de contaminação (LAUBE et al., 2010). Em contrapartida, os ensaios multiplex são mais difíceis de projetar, pelo fato de exigirem o desenho

de iniciadores e sondas compatíveis com temperaturas de anelamento semelhantes e sem a formação de dímeros de iniciador/sonda (FUCHS et al., 2013).

Figura 4.3 - Mecanismo de ação da sonda de hidrólise TaqMan™.



Fonte: adaptado de Gasparic et al. (2010)

Vários ensaios utilizando a sonda TaqMan™ já foram publicados para a detecção e quantificação de *L. sakei* em carne e salsichas fermentadas (MARTÍN et al., 2006), BAL em cerveja (HAAKENSEN et al., 2007) e *W. viridescens* em *morcilla* (GÓMEZ-ROJO et al., 2015). Arahall et al. (2008) estudaram a diferenciação de espécies pertencentes à família *Leuconostocaceae* (*Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella*) e concluíram que o gene *16S rRNA* foi incapaz de distinguir espécies do gênero *Weissella*.

Em vários estudos, o qPCR foi combinado com métodos baseados em cultura para quantificação de bactérias em alimentos (LUEDTKE; BOSILEVAC, 2015; ILHA et al., 2016; KIM et al., 2017. PAPIĆ et al., 2017). O método de TaqMan™ qPCR pode obter dados quantitativos pela construção de curvas-padrão, a partir de concentrações padrão conhecidas, diluídas em série (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2013). Poucos estudos utilizaram curvas-padrão para detecção e quantificação de BAL em produtos cárneos (MARTÍN et al., 2006; ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008; GÓMEZ-ROJO et al., 2015). No estudo relatado por Elizaquível, Chenoll e Aznar (2008), um novo procedimento de TaqMan™ qPCR foi desenvolvido para a detecção e quantificação específica de *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* artificialmente inoculado em produto cárneo, com base no gene alvo *23S rRNA*. Posteriormente, Gómez-Rojo et al. (2015) desenvolveram um ensaio específico de TaqMan™ qPCR para a detecção e quantificação de *W. viridescens* em *morcilla*, com base no gene alvo *recN*.

4.5 DESCRIÇÃO DAS SEÇÕES

Diante do exposto, os resultados desta tese serão apresentados nas seções a seguir, sendo a Seção 5 os resultados sobre o desenvolvimento de um novo protocolo de SYBR® Green qPCR para identificação e quantificação específica de *W. viridescens* e *L. plantarum*, seguida da Seção 6 em que serão apresentados os resultados do uso dos métodos de SYBR® Green qPCR e de CP para construção de curvas de crescimento de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* em culturas puras e mista, seguida da Seção 7, em que serão apresentados os resultados do estabelecimento de modelos preditivos moleculares para descrever o crescimento de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* em culturas puras e mista, e, por fim, a Seção 8 que serão apresentados os resultados do uso combinado dos métodos de TaqMan™ qPCR e de CP para prever o crescimento de BAL em produto cárneo embalado a vácuo.

5. DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROTOCOLO DE SYBR® Green qPCR PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE *Weissella viridescens* E *Lactobacillus plantarum*

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Microrganismos

As BAL *W. viridescens* ATCC 12706™ e *L. plantarum* ATCC 8014™ foram usadas nesse estudo. As cepas foram adquiridas liofilizadas, da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil) e reidratadas em caldo *Lactobacilli* MRS pH 6,5 (Difco™, Detroit, USA) (a composição dos meios de cultura é apresentada no ANEXO I). Em seguida, foram armazenadas em microtubos livres de DNases/RNases (Kasvi, Curitiba, Brasil) com caldo MRS contendo 20% (V/V) de glicerol a -24 °C.

5.1.2 Cultivo do pré-inóculo

Para o preparo do pré-inóculo, as BAL foram reativadas, individualmente, em 160 mL de caldo MRS e incubadas, a 30 °C por 18 horas, em estufa bacteriológica (Modelo 502, Fanem, São Paulo, Brasil). Após o período de incubação, foram coletados 2 mL do caldo MRS, assepticamente, em câmara de fluxo laminar (modelo CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil) para as leituras da densidade óptica (DO) a 600 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro SF325NM (Bel Engineering®, Itália). Baseando-se em estudos prévios realizados no laboratório (DALCANTON, 2010; CAMARGO, 2015; SEVERO, 2018), os valores da DO_{600nm} de 0,9 para *L. plantarum* e DO_{600nm} de 0,38 para *W. viridescens*, ambas de uma diluição 1:10 corresponde à fase estacionária de crescimento das BAL ($\approx 10^9$ UFC/mL).

5.1.3 Preparo e condições dos cultivos

Os experimentos em cultura pura de *W. viridescens* e de *L. plantarum* foram realizados individualmente, em duplicata, em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 320 mL de caldo MRS e 1% do pré-inóculo (V/V), correspondendo à concentração inicial de, aproximadamente, 10^3 UFC/mL, confirmada por CP. As curvas de crescimento foram avaliadas à temperatura isotérmica de 30 °C, conduzidas até a fase estacionária de crescimento. A temperatura foi registrada a cada 1 minuto por mini *data loggers* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha). As quantificações das BAL foram realizadas por semeadura em profundidade em placas de Petri estéreis descartáveis (Kasvi, Curitiba, Brasil) com ágar Lactobacilli MRS (Difco™, Detroit, USA), em duplicata. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas, conforme a ISO 15214:1998 (ANONYMOUS, 1998).

O experimento da cultura mista foi realizado em duplicata em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 320 mL de caldo MRS, 1 mL do pré-inóculo (descrito no item 5.2.2) de *W. viridescens* e 1 mL do pré-inóculo *L. plantarum*, ambos os pré-inóculos previamente diluídos na concentração 10^5 UFC/mL, correspondendo à concentração inicial do experimento de, aproximadamente, 10^3 UFC/mL. As curvas de crescimento foram avaliadas na temperatura de 30 °C, sendo conduzida até a fase estacionária de crescimento.

5.1.4 Elaboração das curvas de crescimento

Em intervalos de tempo pré-determinados (aproximadamente a cada duas horas), 5 mL de cada cultivo foram, assepticamente, coletados em câmara de fluxo laminar (modelo CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil) para determinação da concentração (\log_{10} UFC/mL) de *W. viridescens* e de *L. plantarum* pela análise de turbidez, de CP e de SYBR® Green qPCR.

5.1.4.1 Medição da Turbidez e pH

As leituras de turbidez (DO) das curvas de crescimento das BAL em cultura pura foram obtidas com um espectrofotômetro SF325NM (Bel Engineering®, Itália) a 600 nm (DO_{600nm}) a cada duas horas até fase estacionária de crescimento, utilizando 2 mL de cultivo coletados em tubo com

16 mm de diâmetro, de acordo com a metodologia descrita por Dalcanton (2010). Nesses intervalos de tempo, foram obtidos os valores de pH com um pHmetro digital de alta precisão PH-221 (Lutron, Taiwan).

5.1.4.2 Método de contagem em placa (CP)

As quantificações foram realizadas conforme descrito no item 5.2.3.

5.1.4.3 Método de SYBR® Green qPCR

As amostras dos cultivos foram armazenadas a -24 °C em microtubos livres de DNases/RNases (Kasvi, Curitiba, Brasil) para posterior extração do DNA e preparo das reações de SYBR® Green qPCR, como descrito a seguir.

5.1.4.3.1 *Extração do DNA*

O DNA foi extraído de 2 mL da cultura bacteriana, utilizando-se do UltraClean® *Microbial DNA Isolation Kit* (Qiagen MOBIO Laboratories, Carlsbad, USA), de acordo com as recomendações do fabricante para bactérias gram-positivas. O processo foi efetuado conforme o manual de instruções do kit UltraClean®.

O DNA foi quantificado com um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ ND-1000 (Wilmington, Delaware, USA). A partir da razão da absorbância a 260 e a 280 nm (A_{260}/A_{280}), foi avaliada a qualidade do DNA (NANODROP TECHNOLOGIES, 2007). Para a razão comprimento de onda A_{260}/A_{280} , o valor ideal de pureza está entre 1,8 e 2,0 (VIANA et al., 2012).

5.1.4.3.2 *Iniciadores*

O par de iniciadores que amplifica um fragmento de 91 pb do gene *recN* (número de acesso no GenBank: AM698022.1) (GÓMEZ-ROJO et al., 2015) foi utilizado para a quantificação

de *W. viridescens*. Os iniciadores foram: WvrecNF (CGCAAACACAACAAGCCTAT) e WvrecNR (TGTTGAGCAAGTTCCAAAGC).

Para a quantificação de *L. plantarum*, o gene *recA* (número de acesso no GenBank: KP231051.1) foi selecionado como alvo para os iniciadores, que foram desenhados com a utilização do programa GenScript® *Primer Design* (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_genscript.cgi). Os iniciadores foram: *recA-F* (AGTTTCCAGTGGTGC GGTCG) e *recA-R* (CGCGCTTGTAACCCAACGTG). Para avaliar a adequação dos iniciadores, os valores de ΔG (kcal/mol) de formação de estruturas secundárias e de complementaridade foram testados no programa OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Adicionalmente, os iniciadores foram analisados quanto à especificidade por pesquisa de similaridade com outras cepas do mesmo gênero, utilizando a ferramenta PRIMER-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) no banco de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Todos os iniciadores foram sintetizados pela IDT® (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralvill, USA) na escala de 25 nmol dessalinizados.

5.1.4.3.3 Especificidade dos iniciadores

A especificidade do conjunto de iniciadores foi testada em função das amostras de DNA de bactérias alvo e não alvo, comumente encontradas em carnes e produtos cárneos, e/ou filogeneticamente relacionadas às espécies alvo (Tabela 5.1). As amostras de DNA de controle positivo e negativo foram fixadas em 10 ng de DNA na mistura de reação.

As espécies do gênero *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. e *Weissella* spp. foram cultivadas em caldo *Lactobacilli* MRS (Difco™, Detroit, USA) a 30 °C, durante 24 horas. A espécie *Pseudomonas fluorescens* foi cultivada em caldo *Brain-Heart Infusion* (Bacto™ BHI, Detroit, USA) a 30 °C, durante 24 horas. As medidas de DO_{600nm} das culturas bacterianas foram realizadas em espectrofotômetro SF325NM (Bel Engineering®, Itália).

Avaliou-se a especificidade dos iniciadores por meio da curva de *melting* das reações de SYBR® Green qPCR (ver item 5.2.4.3.4). Em segundo lugar, a especificidade foi verificada

utilizando 10 ng de DNA bacteriano não alvo misturado com quantidades inferiores de DNA alvo, nas proporções: 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10⁶ e os valores de T_M e C_T foram comparados.

Tabela 5.1 - Bactérias utilizadas para o teste de especificidades dos iniciadores.

Bactérias	Número de referência	Origem	Referência
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> **	450	-	Danisco® (Cotia, São Paulo, Brasil)
<i>Lactobacillus casei</i>	93	-	Lyofast® (SACCO)
<i>Lactobacillus paracasei</i> *	7501	-	- ^C
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> *	15521	-	- ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8014	-	- ^T
	8293	Azeitonas fermentadas	- ^T
	219	-	- ^E
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	66	<i>Morcilla</i>	Santos et al. (2005b)
	L ₁	<i>Morcilla</i>	Diez et al. (2009a)
	L ₈	<i>Morcilla</i>	Diez et al. (2009a)
	L ₃₅	<i>Morcilla</i>	Diez et al. (2009a)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13525	-	- ^T
	12706	Produto cárneo curado	- ^T
	283	-	- ^E
<i>Weissella viridescens</i>	132	<i>Morcilla</i>	Santos et al. (2005b)
	W ₁	<i>Morcilla</i>	Diez et al. (2009a)
	W ₈	<i>Morcilla</i>	Diez et al. (2009a)
	W ₃₅	<i>Morcilla</i>	Diez et al. (2009a)

^CCCT – Coleção de Culturas Tropicais

^TATCC – Coleção de Culturas Tipo Americana

^ECECT – Coleção de Culturas do Tipo Espanhol

*fornecida pelo Laboratório de Biologia Molecular-UFSC/CCA/CAL

**fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos-UFSC/CCA/CAL

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

5.1.4.3.4 Condições de ciclagem do SYBR® Green qPCR

O método de SYBR® Green qPCR foi executado no equipamento Real Time Rotor-Gene Q® (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia

de Leveduras – BQA/CCB/UFSC, com 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 fluorescente ao final de cada etapa de extensão.

As condições de ciclagem para a quantificação de *W. viridescens* foram aplicadas como descrito por Gómez-Rojo et al. (2015). A técnica otimizada de SYBR® Green qPCR foi realizada com um volume final de 25 µL contendo: 12,5 µL de 2 × Rotor-Gene SYBR® Green Master Mix, 300 nM dos iniciadores recN-F/R e 2 µL do DNA molde. Água livre de DNase/RNase foi adicionada para obter um volume final de 25 µL. Todas as reações foram realizadas em triplicata, sob as seguintes condições de ciclagem: 5 min a 95 °C, seguida 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.

As condições de ciclagem para a quantificação de *L. plantarum* foram aplicadas como descrito por Torriani et al. (2001), com algumas modificações. O método otimizado de SYBR® Green qPCR foi realizado com um volume final de 25 µL contendo: 12,5 µL de 2 × Rotor-Gene SYBR® Green Master Mix, 0,12 µM dos iniciadores recA-F/R e 2 µL do DNA molde. Água livre de DNase/RNase foi adicionada para obter um volume final de 25 µL. Todas as reações foram executadas em triplicata, sob as seguintes condições de ciclagem: 3 min a 94 °C, seguida por 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 10 s a 56 °C, 30 s a 72 °C e uma fase final de extensão feita por 5 min a 72 °C.

Em todas as reações realizadas nesse estudo, após a amplificação completa das reações de SYBR® Green qPCR, uma análise de *melting* foi realizada partindo de 65 °C para 95 °C com acréscimos de 0,5 °C/s. Além disso, cada rotor incluía uma amostra com água livre de DNase/RNase como controle negativo.

5.1.4.3.5 Construção das curvas-padrão

As curvas-padrão relacionadas às contagens em placa foram construídas ao correlacionar os valores de C_T em função do \log_{10} UFC/mL de *W. viridescens* e de *L. plantarum*. Os valores de C_T foram estimados utilizando o DNA extraído da cultura pura na fase estacionária de crescimento, que foi diluído em água *Milli-Q*. A partir desse valor, os valores em \log_{10} UFC/mL de cada diluição

seriada foram considerados constantes para a construção da curva-padrão. O limiar foi determinado usando a função *Auto-Find Threshold* do Rotor-Gene Q[®], que ajusta uma faixa de níveis de limiar para obter o resultado ótimo da curva-padrão. Os valores de LoD (do inglês: *limit of detection*) e o LoQ (do inglês: *limit of quantification*) foram determinados, conforme descrito por Papić et al. (2017). De acordo com Berdal e Holst-Jensen (2001), o valor de LOD é de 5 a 10 vezes menor do que o de LOQ em amostras complexas.

A eficiência da amplificação foi determinada a partir da Equação 5.1 (PFAFFL, 2001; RUTLEDGE, 2003; BUSTIN et al., 2009), na qual S representa a inclinação da reta de regressão linear e E , a eficiência de amplificação. Por exemplo, para 100% de eficiência de amplificação, tem-se $E = 1$ e $S = 3,32$.

$$E = 10^{(-1/S)} - 1 \quad (5.1)$$

5.1.5 Análise comparativa entre os métodos

A comparação entre os resultados obtidos pelo método de CP e SYBR[®] Green qPCR foi realizada por análise de regressão linear usando a técnica de Passing-Bablok (PASSING; BABLOK, 1983) calculado pelo MedCalc 17.1 (MedCalc[®] Software, Bélgica) com um nível de significância de $p < 0,0001$ e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Os limites de concordância entre os dois métodos foram avaliados utilizando o teste de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1986). Os gráficos de Bland-Altman foram gerados usando o GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Prism[®] Software, USA).

5.1.6 Exatidão relativa entre CP e SYBR[®] Green qPCR

A exatidão relativa foi expressa como uma razão percentual entre as contagens em \log_{10} por SYBR[®] Green qPCR e CP, conforme a Equação 5.2.

$$\text{Exatidão relativa (\%)} = \frac{\log_{10} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \text{ determinado por qPCR}}{\log_{10} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \text{ determinado por CP}} \times 100 \quad (5.2)$$

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Seleção e especificidade dos iniciadores

A especificidade de cada conjunto de iniciadores foi avaliada por ampliações de SYBR® Green qPCR, com a análise da T_M do DNA molde (10 ng) extraído de *W. viridescens* e de *L. plantarum*, e de outras seis espécies bacterianas (ver Tabela 5.2) como controle negativo. O DNA extraído das culturas puras para o teste de especificidade apresentou uma boa qualidade, fundamentando-se na razão da absorbância A_{260}/A_{280} , determinada por espectrofotometria (resultados não apresentados).

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores de C_T e T_M obtidos no teste de especificidade para os pares de iniciadores *recN* utilizando DNA extraído de cepas de *W. viridescens* (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos).

O par de iniciadores *recN* apresentou amplificação para as cepas de *W. viridescens* com valor de C_T (média \pm desvio-padrão) igual a $12,32 \pm 0,42$ sob as condições ideais de reação e o fragmento amplificado apresentou valor de T_M (média \pm desvio-padrão) de $81,03 \pm 0,05$ °C (Tabela 5.2). Não foi verificada amplificação (sem C_T) ou valores tardios de C_T ($C_T > 37$) para *P. fluorescens* e água Milli-Q. Outros controles negativos apresentaram amplificação inespecífica (3 positivos de 3 repetições), com valores de C_T tardios e diferentes T_M em relação ao T_M obtido para *W. viridescens*. Além disso, *L. plantarum* apresentou valores de C_T maior que 27. *L. mesenteroides*, *L. casei*, *L. paracasei* e *L. bulgaricus* apresentaram ampliações inespecíficas com valores de C_T tardios ($C_T > 31$) e diferentes valores de T_M (Tabela 5.2). Na Tabela 5.3 são apresentados os valores de C_T e T_M obtidos no teste de especificidade para os pares de iniciadores *recA* utilizando DNA extraído de cepas de *L. plantarum* (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos).

Para a diferenciação de espécies de *Lactobacillus* spp., vários genes de codificação de proteínas têm sido alvo como marcadores filogenéticos (*tuf*, *hsp60*, *dnaK*, *pheS* e *rpoA*), disponíveis na literatura (NASER et al., 2007; HUANG et al., 2010; YU et al., 2012). Torriani et al. (2001) diferenciaram as espécies *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum* por meio da comparação da sequência do gene *recA*. No entanto, não foi encontrado, na literatura, o uso desse gene para a quantificação de espécies de *Lactobacillus* spp. Assim, o gene *recA* foi selecionado, neste estudo, como alvo para a quantificação de *L. plantarum*, pois apresenta uma boa resolução a um elevado nível de discriminação (máxima identidade com *L. fabifermentans* de 50%).

O par de iniciadores desenhados para o gene *recA* apresentou amplificação para *L. plantarum* com valor de C_T igual a $13,62 \pm 0,25$ sob as condições ideais de reação e o fragmento amplificado apresentou um valor de T_M de $83,1 \pm 0,19$ °C (Tabela 5.3). Não foi verificada amplificação (sem C_T) ou valor tardio de C_T ($C_T > 33$) quando a água *Milli-Q* foi utilizada como controle negativo. Entre as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, apenas *L. casei* e *L. bulgaricus* apresentaram um breve sinal de amplificação inespecífica ($C_T < 24$) com valores de T_M inferiores ao obtido para *L. plantarum*. Entretanto, como as espécies *L. casei* e *L. bulgaricus* não são encontradas na microbiota deteriorante de produtos cárneos, o par de iniciadores *recA* pode ser usado para a quantificação de *L. plantarum* nesses produtos. Outros controles negativos apresentaram valores de C_T tardios e diferentes valores de T_M , *L. sakei* subsp. *sakei*, *L. paracasei*, *P. fluorescens* e *W. viridescens* apresentaram valores de C_T maiores que 29. *L. mesenteroides* apresentou amplificação inespecífica com valores de C_T tardios ($C_T > 30$) e diferentes valores de T_M (Tabela 5.3).

Tabela 5.2 - Teste de especificidade para os pares de iniciadores *recN* utilizando DNA extraído de cepas de *W. viridescens* (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos). Os valores de C_T e T_M em negrito indicam os valores para o DNA alvo.

Bactéria	C_T	T_{M1}	T_{M2}	Bactéria	C_T	T_{M1}	T_{M2}
	12,78	81,25			31,82	65,65	69,00
<i>W. viridescens</i> ATCC 12706	11,93	81,10		<i>L. mesenteroides</i> L ₈	32,11	67,75	70,50
	13,17	81,10					
	11,33	81,15			37,54	70,00	72,25
<i>W. viridescens</i> CECT 283	11,98	81,15		<i>L. mesenteroides</i> L ₃₅	ND	ND	
	11,53	81,15					
	13,93	81,00			29,38	71,75	74,00
<i>W. viridescens</i> I32	13,88	81,00		<i>L. plantarum</i>	29,19	67,25	69,90
	13,74	80,90			27,70	67,65	72,25
	11,74	81,00			-	-	
<i>W. viridescens</i> W ₁	11,69	81,00		<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	-	-	
	12,32	81,00			-	-	
	11,57	80,90			37,08	80,60	
<i>W. viridescens</i> W ₈	11,41	81,00		<i>L. casei</i>	35,49	85,35	
	11,89	80,90			30,97	80,85	
	12,04	81,00			31,15	66,40	69,25
<i>W. viridescens</i> W ₃₅	12,52	81,00		<i>L. paracasei</i>	33,61	67,00	70,50
	12,30	81,00			31,45	80,75	
	31,41	72,25	75,10	<i>L. bulgaricus</i>	31,50	80,40	
<i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	37,86	72,65	74,10		32,80	80,75	
	31,25	72,25	77,60		31,77	80,50	
	34,44	69,60	72,15	<i>P. fluorescens</i>	ND	ND	
<i>L. mesenteroides</i> CECT 219	35,57	65,90	71,65		38,37	83,75	88,00
					ND	ND	
	32,23	67,50	71,25	Água Milli-Q	37,44	73,25	
<i>L. mesenteroides</i> 66	37,79	69,00	70,65		ND	ND	
					ND	ND	
	33,20	70,15	75,10				
<i>L. mesenteroides</i> L ₁	34,83	65,50	68,50				

ND = não detectado.

- = não realizado.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 5.3 - Teste de especificidade para os pares de iniciadores *recA* utilizando DNA extraído de *L. plantarum* (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos). Os valores de C_T e T_M em negrito indicam os valores para o DNA alvo.

Bactéria	C_T	T_{M1}	T_{M2}	Bactéria	C_T	T_{M1}	T_{M2}
<i>L. plantarum</i>	14,16	83,00			33,26	78,30	86,40
	13,54	82,75		<i>L. mesenteroides L₁</i>	32,56	79,80	86,90
	13,16	83,50					
<i>W. viridescens ATCC 12706</i>	29,96	71,90	75,75		30,45	68,35	74,55
	30,56	71,10	73,65	<i>L. mesenteroides L₈</i>	30,73	66,85	
	29,10	75,40	78,10				
<i>W. viridescens CECT 283</i>	30,88	65,40	67,95		32,88	69,55	
	29,90	65,10	66,80	<i>L. mesenteroides L₃₅</i>	31,55	68,75	
<i>W. viridescens 132</i>	32,58	71,35	72,15		29,72	69,75	72,00
	33,50	64,70	68,90	<i>L. sakei subsp. sakei</i>	28,67	71,40	74,35
					29,22	72,00	76,00
<i>W. viridescens W₁</i>	29,28	72,10	74,65		18,10	75,50	77,75
	29,78	71,85	73,60	<i>L. casei</i>	19,96	78,85	
					17,66	74,35	76,25
<i>W. viridescens W₈</i>	33,40	74,35	76,75		28,97	75,75	78,35
	33,52	74,55	76,25	<i>L. paracasei</i>	29,78	71,65	74,35
					29,56	68,00	
<i>W. viridescens W₃₅</i>	30,24	68,75	73,00		23,38	72,40	74,75
	31,59	73,45	77,35	<i>L. bulgaricus</i>	22,69	73,75	76,75
					23,14	71,60	74,25
<i>L. mesenteroides ATCC 8293</i>	31,07	73,00	75,00		27,18	75,25	78,60
	31,93	71,25		<i>P. fluorescens</i>	27,42	74,15	77,10
	31,57	73,50	76,90		29,18	ND	
<i>L. mesenteroides CECT 219</i>	34,44	73,70		Água Milli-Q	33,38	68,25	
	35,37	74,30	77,80		ND	ND	
					ND	ND	
<i>L. mesenteroides 66</i>	35,24	63,70					
	33,88	65,30					

ND = não detectado.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Masco et al. (2007) usaram o método de qPCR visando os genes *16S rRNA* e *recA* de cópia única para enumeração de bifidobactéria em produtos probióticos e compararam os resultados de ambos os ensaios. Eles descobriram que a quantificação do gene *16S rRNA* mostrou-se mais sensível que o teste baseado em *recA*, especialmente em produtos probióticos contendo

baixas concentrações de bifidobactéria. No entanto, nessas amostras, o limite de detecção do ensaio de qPCR embasado no gene *16S rRNA* foi menor que o ensaio de qPCR baseando-se no gene *recA*.

Em muitos casos, o método de qPCR é aplicado para o DNA extraído de uma microbiota complexa, no qual as espécies alvo não são, necessariamente, as dominantes (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013). Assim, a especificidade de cada conjunto de iniciadores também foi verificada em uma mistura contendo 10 ng do DNA não alvo na reação. A amplificação do DNA alvo de *W. viridescens* e de *L. plantarum* não foi afetada com maiores concentrações de DNA não alvo na reação (Tabela 5.4). Não foi observada diferença entre os valores de T_M quando até 10^6 vezes mais DNA não alvo estava presente na reação. Além disso, quando apenas o DNA alvo estava presente, não houve grande variação nos valores de C_T . Para *L. plantarum*, os valores de C_T variaram entre 10,22 a 10,76 e, para *W. viridescens*, os valores de C_T variaram entre 9,78 a 10,47, conforme indicado com barras cinzas na Tabela 5.4. Em oposição a isso, quanto menor a quantidade de DNA alvo na reação, maior foram os valores de C_T , como por exemplo, para as reações dos iniciadores de *W. viridescens* na presença de diferentes concentrações do DNA de *L. mesenteroides* (DNA não alvo), os valores de C_T variaram entre 14,21 a 26,49. Esses resultados comprovam que o DNA de bactérias não alvo não influenciaram nas reações de SYBR® Green qPCR para cada BAL.

Tabela 5.4 - Valores de T_M e C_T obtidos para a mistura do DNA alvo com o DNA não alvo. O controle positivo, sem DNA não alvo presente na reação, é indicado em barras cinzas para cada par de iniciadores.

Cepas	T_M e C_T	Iniciadores <i>L. plantarum</i> (<i>recA</i>)				Iniciadores <i>W. viridescens</i> (<i>recN</i>)			
		1:10 ^a	1:100 ^b	1:1000 ^c	1:10 ^{6d}	1:10 ^a	1:100 ^b	1:1000 ^c	1:10 ^{6d}
<i>L. plantarum</i>	T_M	83,50	83,50	83,50	83,35	81,25	81,25	81,25	81,25
	C_T	10,71	10,22	10,61	10,76	14,01	17,11	20,44	28,36
<i>W. viridescens</i>	T_M	83,60	83,50	83,25	83,50	81,40	81,40	81,00	81,35
	C_T	12,55	13,49	16,55	20,53	10,40	10,47	9,78	10,46
<i>L. mesenteroides</i>	T_M	83,50	83,40	83,50	83,40	81,35	81,40	81,25	81,25
	C_T	14,71	17,27	20,53	24,93	14,21	17,21	21,59	26,49
<i>P. fluorescens</i>	T_M	83,50	83,50	83,25	83,35	81,50	81,35	81,25	81,15
	C_T	14,70	17,48	25,73	20,81	14,13	17,64	20,65	27,82

^a1 ng do DNA alvo misturado com 10 ng do DNA não alvo.

^b0,1 ng do DNA alvo misturado com 10 ng do DNA não alvo.

^c0,01 ng do DNA alvo misturado com 10 ng do DNA não alvo.

^d0,00001 ng do DNA alvo misturado com 10 ng do DNA não alvo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

5.2.2 Validação do ensaio SYBR® Green qPCR

As cepas de *W. viridescens* e de *L. plantarum* foram cultivadas a 30 °C em cultura pura, em caldo MRS, para a construção de curvas-padrão relacionando as contagens em placas (\log_{10} UFC/mL) aos sinais de detecção de SYBR® Green qPCR.

O valor de LoD foi $4,2 \times 10^3$ UFC/mL de *W. viridescens*, o que corresponde a 32,5 fentograma (fg) de DNA por reação e valores de C_T entre 27,49-30,40 (IC 95%). A concentração de $4,2 \times 10^7$ UFC/mL obtida por CP de *W. viridescens* gerou um C_T de $16,62 \pm 0,01$ (Tabela 5.5). Esses resultados corroboram com os encontrados no trabalho de Gómez-Rojo et al. (2015) que, para uma concentração de 10^7 UFC/mL, obtiveram um C_T de $15,4 \pm 0,6$ para a quantificação de *W. viridescens* CETC 283™ em meio de cultivo ao utilizar sonda TaqMan™.

Tabela 5.5 - Medidas de C_T das reações de SYBR® Green qPCR para as diluições decimais do DNA de *W. viridescens* e de *L. plantarum*.

DNA por reação (ng)	UFC em meio de cultura (UFC/mL) ^a	C_T ^b	IC ^c inferior	IC superior
<i>Weissella viridescens</i>				
32,5	$4,2 \times 10^9$	$10,43 \pm 0,04$	10,23	10,63
$32,5 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^7$	$16,62 \pm 0,01$	16,59	16,66
$32,5 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^5$	$23,38 \pm 0,07$	23,05	23,71
$32,5 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^3$	$28,95 \pm 0,30$	27,49	30,40
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
31,0	$4,3 \times 10^9$	$7,47 \pm 0,05$	7,23	7,71
$31,0 \times 10^{-2}$	$4,3 \times 10^7$	$13,95 \pm 0,14$	13,28	14,62
$31,0 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^5$	$20,59 \pm 0,15$	20,29	20,89
$31,0 \times 10^{-6}$	$4,3 \times 10^3$	$25,33 \pm 0,04$	25,12	25,54

^aObtido por CP.

^bMédia \pm Desvio-padrão dos valores de C_T obtidos em triplicata.

^cIC: Intervalo de confiança de 95%.

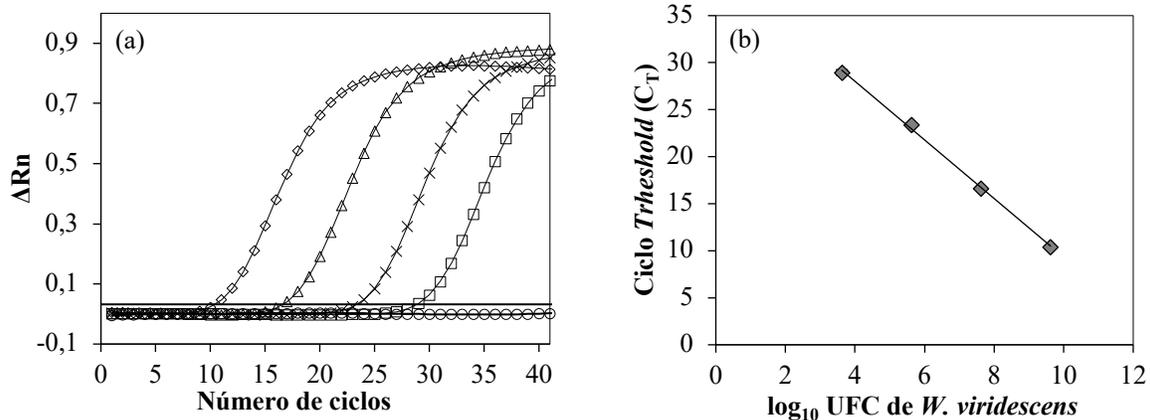
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O LoD de *L. plantarum* correspondeu a $4,3 \times 10^3$ UFC/mL, equivalente a 31 fg de DNA por reação e valores de C_T entre 25,12-25,54 (IC 95%) (Tabela 5.5). Outros autores também relataram limites semelhantes de detecção e quantificação de BAL, tais como *Lactococcus garvieae* (32 fg por reação) (JUNG et al., 2010), *Lactococcus lactis* ($8,8 \times 10^3$ UFC/g) (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013) e *W. viridescens* (10^3 UFC/g) (GÓMEZ-ROJO et al., 2015).

Severo (2018) reportou valor de LoD de $2,7 \times 10^2$ UFC/mL para *L. mesenteroides* em meio de cultivo a 20 °C.

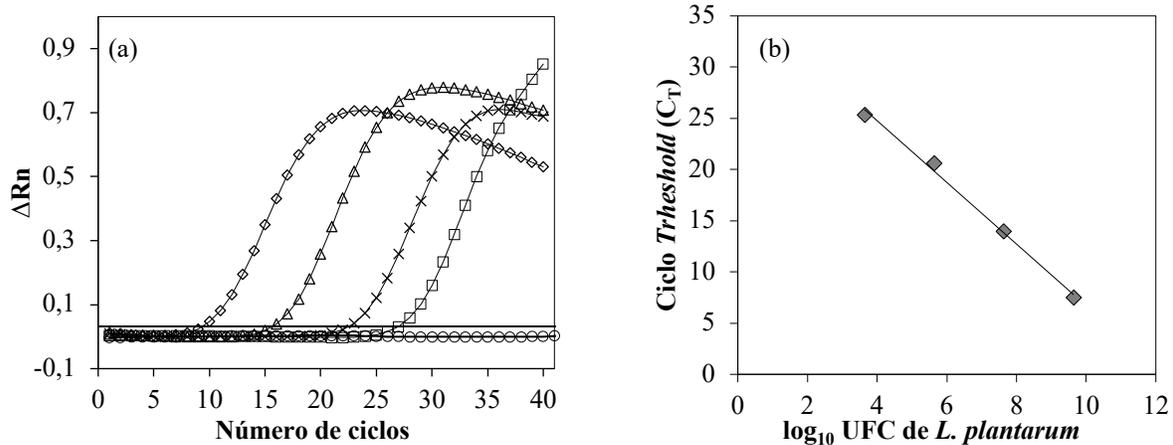
Os ensaios de SYBR® Green qPCR apresentados acima detectaram, especificamente, *W. viridescens* e *L. plantarum* em meio de cultivo. Os gráficos típicos de amplificação (ΔRn versus ciclos de SYBR® Green qPCR) construídos a partir dos dados de fluorescência e as respectivas curvas-padrão geradas para a quantificação de *W. viridescens* e de *L. plantarum* são representadas nas Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente.

Figura 5.1 - Curva-padrão obtida para *Weissella viridescens* em meio de cultivo a 30 °C. Gráficos representativos de amplificação. a) Aumento da fluorescência (ΔRn) em relação ao número de ciclos de SYBR® Green qPCR para diluições em séries de *W. viridescens* correspondente a $4,2 \times 10^9$ (-◇-), $4,2 \times 10^7$ (-△-), $4,2 \times 10^5$ (-×-), $4,2 \times 10^3$ (-□-) UFC/mL, amostra controle (-○-) e limiar (-). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T obtidos por SYBR® Green qPCR em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de *W. viridescens*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 5.2 - Curva-padrão obtida para *Lactobacillus plantarum* em meio de cultivo a 30°C. Gráficos representativos de amplificação. a) Aumento da fluorescência (ΔRn) em relação ao número de ciclos de qPCR para diluições em séries de *L. plantarum* correspondente a $4,3 \times 10^9$ ($-\diamond-$), $4,3 \times 10^7$ ($-\Delta-$), $4,3 \times 10^5$ ($-\times-$), $4,3 \times 10^3$ ($-\square-$) UFC/mL, amostra controle ($-\circ-$) e limiar ($-$). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T obtidos por SYBR[®] Green qPCR em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de *L. plantarum*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A curva-padrão apresenta uma inclinação de -3,14, correspondente a uma eficiência de reação (E) de 1,08 (108%) para *W. viridescens* (Equação 5.3); uma inclinação de -2,99, equivalente a uma eficiência de reação (E) de 1,16 (116%) para *L. plantarum* (Equação 5.4).

$$C_T = -3,14 \times (\log_{10} \text{ UFC}) + 40,47 \quad (5.3)$$

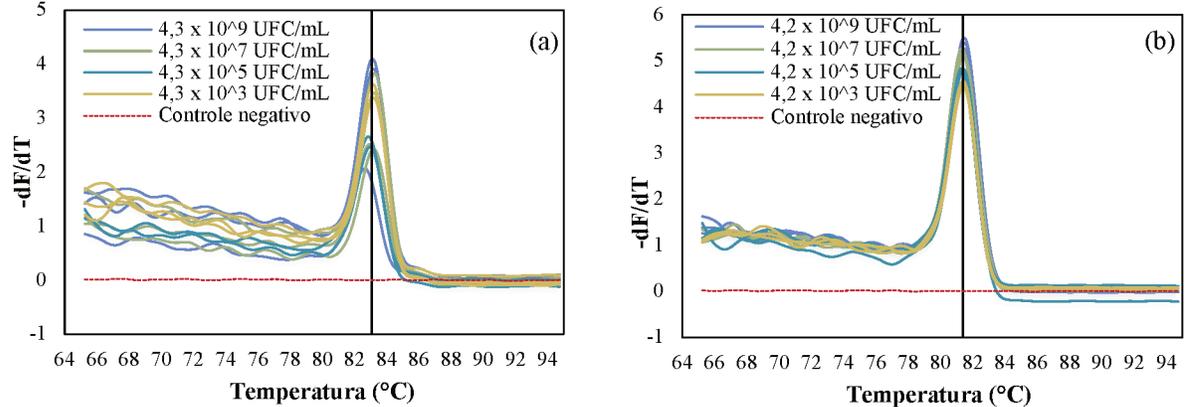
$$C_T = -2,99 \times (\log_{10} \text{ UFC}) + 36,65 \quad (5.4)$$

Todas as curvas-padrão apresentaram um coeficiente de determinação (R^2) de 0,99. Esses resultados indicam que apenas a eficiência de amplificação dos iniciadores *recN* de *W. viridescens* atende ao requisito padrão de qPCR (eficiência entre 90% e 110% com R^2 entre 0,985-1,00) (McPHERSON; MØLLER, 2006). Acerca da curva-padrão para *L. plantarum*, uma eficiência acima de 110% pode indicar a ocorrência de uma inibição durante a reação, sendo necessários mais testes com concentrações diferentes de iniciadores ou temperaturas de anelamento, a fim de obter melhorias na eficiência dessa curva.

Após a amplificação completa do SYBR[®] Green qPCR, as curvas de *melting* foram geradas ao plotar a derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT) versus a temperatura (°C) para *L. plantarum* (Figura 5.3a) e *W. viridescens* (Figura 5.3b). As curvas de *melting* obtidas por SYBR[®] Green qPCR demonstraram a inexistência de dímeros de iniciadores ou produtos não específicos, com formação de um único pico visível para *W. viridescens* e para *L. plantarum*. O fragmento amplificado específico de *W. viridescens* apresentou uma T_M (média ± desvio- padrão) de 81,4 ± 0,04 °C, enquanto o fragmento específico de *L. plantarum* apresentou uma T_M de 83,1 ± 0,10 °C. Alguns autores também reportaram valores de T_M para outras BAL a fim de verificar a especificidade das reações de SYBR[®] Green qPCR, como para *L. plantarum* deteriorante de vinhos (T_M = 84,64 °C) (KÁNTOR et al., 2016), para *L. paracasei* em iogurtes (T_M = 78,3 °C) (ILHA et al., 2016) e para *Lactobacillus delbrueckii* em queijos (T_M = 80,9 °C) (ACHILLEOS; BERTHIER, 2017).

Na Figura 5.3, verifica-se que o tamanho do pico de *melting* está relacionado à concentração da amostra na reação. Por exemplo, na Figura 5.3b, a amostra com 4,2 × 10⁹ UFC/mL apresentou um pico de *melting* superior ao da amostra com 4,2 × 10³ UFC/mL. Esse fato não se aplica à curva de *L. plantarum* (Figura 5.3a), em que algumas amostras com menores concentrações apresentaram maiores picos de *melting*. Ainda, nessa curva, observa-se uma amplificação inicial inespecífica, que corrobora com o gráfico da Figura 5.2a, no qual as curvas de amplificação de *L. plantarum* representaram uma fase platô atípica, cujos valores de fluorescência decaíram após o 24º ciclo de amplificação. Logo, os iniciadores projetados para o gene *recA* necessitam de experimentos adicionais, a exemplo de análises com concentrações diferentes e de usos de outras cepas como controle positivo, a fim de obter melhorias na especificidade e na eficiência da curva-padrão. As principais limitações para a não execução de experimentos adicionais, foi a ausência de mais cepas para testes de especificidade como controle positivo e negativo. No entanto, como os resultados permitiram a diferenciação entre as cepas, as curvas-padrão desenvolvidas nesse estudo foram utilizadas para identificar e quantificar as espécies *W. viridescens* e *L. plantarum* em cultura pura e mista cultivadas a 30 °C.

Figura 5.3 - Curvas de *melting* para as diluições em série da cultura pura de *L. plantarum* (a) com uma T_M de $83,1 \pm 0,10$ °C e *W. viridescens* (b) com uma T_M de $81,4 \pm 0,04$ °C. A linha vertical preta representa a T_M média de cada cultura pura. A curva tracejada em vermelho representa o controle negativo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

5.2.3 Comparação entre CP e SYBR® Green qPCR para quantificação das cinéticas de crescimento

As amostras do cultivo puro foram coletadas em intervalos pré-determinados a contar do tempo de inoculação. O DNA foi extraído de cada ponto do cultivo e quantificado por espectrofotometria. As quantificações para elaboração das cinéticas de crescimento foram obtidas por CP e SYBR® Green qPCR.

5.2.3.1 Rendimento e qualidade do DNA

O rendimento e a qualidade do DNA extraído da cultura pura de *W. viridescens* e de *L. plantarum*, desde a inoculação até a fase estacionária de crescimento, estão apresentados na Tabela 5.6. A pureza, relativa à razão de absorvância A_{260}/A_{280} (NANODROP TECHNOLOGIES, 2007), foi utilizada para avaliar a qualidade do DNA. Para Viana et al. (2012), a razão comprimento de onda A_{260}/A_{280} os valores entre 1,8 e 2,0 são ideais de pureza. Abaixo de 1,8 provavelmente há contaminação por proteínas, enquanto acima de 2,0, a contaminação provável é por metabólitos secundários ou componentes do tampão de extração. A alta qualidade do DNA foi obtida de *W. viridescens* com uma relação A_{260}/A_{280} . No entanto, observou-se uma baixa relação A_{260}/A_{280}

apenas nas primeiras 6 horas de cultivo: 1,60 a 1,72. O DNA de alta qualidade também foi obtido de *L. plantarum* com uma relação A_{260}/A_{280} e foi observada uma baixa relação A_{260}/A_{280} em apenas algumas amostras: em 6 e 8 horas de cultivo, uma relação de 1,68 e 1,64, respectivamente. Esses resultados podem estar relacionados ao rendimento do DNA extraído, pois nas primeiras horas de cultivo, a quantidade de células extraídas é baixa. Os rendimentos de DNA variaram de 2,3 ng/ μ L, no início do cultivo de *W. viridescens*, a 32,5 ng/ μ L na fase estacionária de crescimento (29 horas) e 3,0 ng/ μ L no início do cultivo de *L. plantarum* a 43,8 ng/ μ L na fase estacionária de crescimento (24 horas).

Tabela 5.6 - Valores do rendimento e qualidade do DNA (A_{260}/A_{280}) de *W. viridescens* e de *L. plantarum* em relação ao tempo de cultivo.

Tempo de cultivo (horas)	Rendimento (ng/ μ L)	Qualidade (A_{260}/A_{280})	Tempo de cultivo (horas)	Rendimento (ng/ μ L)	Qualidade (A_{260}/A_{280})
<i>Weissella viridescens</i>			<i>Lactobacillus plantarum</i>		
0	2,3	1,60	0	5,9	2,15
2	2,5	1,78	2	4,6	2,57
4	3,4	1,73	4	3,0	1,92
6	3,1	1,72	6	8,4	1,68
8	3,6	1,97	8	11,7	1,64
10	2,9	2,05	10	3,8	2,41
12	5,3	1,99	12	6,4	2,20
15	5,8	1,88	14	14	1,86
18	21,7	1,94	16	29,1	1,92
20	18,6	1,99	18	43,8	2,01
23	18,7	1,85	20	36,7	1,84
27	16,4	1,98	22	17,8	1,89
29	32,5	1,88	24	31	1,87

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

5.2.3.2 Estabelecimento das cinéticas de crescimento em cultura pura

A especificidade das reações para a quantificação das cinéticas de crescimento em cultura pura também foi obtida pela análise da T_M , em que um único pico de *melting* foi observado para cada conjunto de iniciadores, ou seja, cada conjunto de iniciadores amplificou um único local do genoma de *W. viridescens* e de *L. plantarum* (Figuras apresentadas no APÊNDICE A). Os valores de T_M reafirmam os obtidos nas reações de especificidade e validação dos ensaios descritos nas

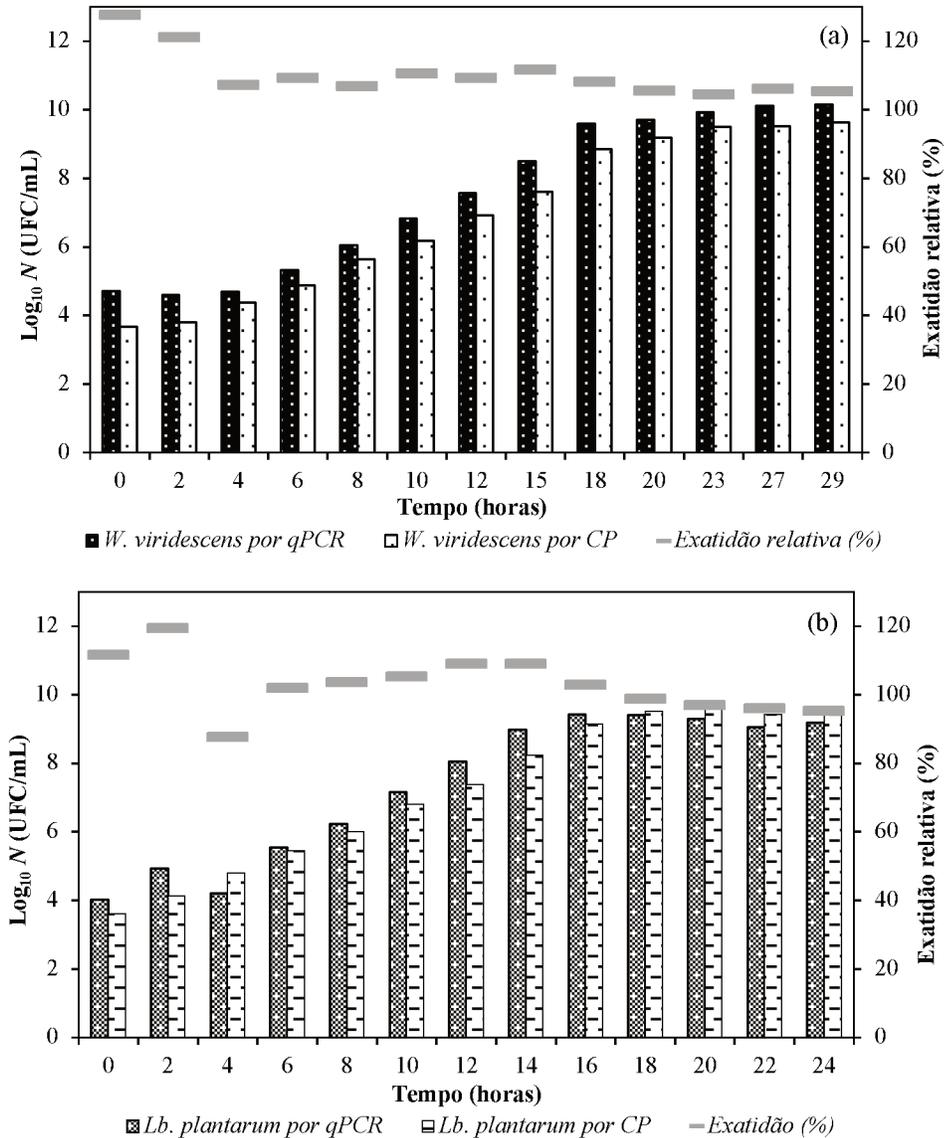
seções 5.3.1 e 5.3.2, demonstrando a especificidade das reações de SYBR[®] Green qPCR para quantificação das cinéticas de *W. viridescens* e de *L. plantarum* em cultura pura.

Em primeiro lugar, as BAL foram quantificadas pela análise da turbidez em caldo MRS com espectrofotômetro a 600 nm. Os resultados da análise mostraram que não foi possível quantificar as BAL em concentrações abaixo de 10⁶ UFC/mL. Segundo Dalcanton (2010), o limite de quantificação de *L. sakei*, *L. plantarum* e *W. viridescens* por análise da turbidez foi de 10⁶ UFC/mL, em caldo MRS. Assim, esse método foi utilizado apenas para acompanhar as curvas de crescimento.

As medidas dos valores de C_T obtidos nas reações de SYBR[®] Green qPCR foram transformadas em concentrações (usando as equações da regressões lineares apresentadas nas Equações 5.3 e 5.4) resultando em um modelo de dados com uma distribuição estimada de concentrações celulares (log₁₀ UFC/mL) relacionadas aos valores de C_T medidos para as quantificações das BAL (Figuras 5.4 (a) e (b)). Todos os valores das concentrações de *W. viridescens* e de *L. plantarum*, bem como os valores de C_T e T_M obtidos das reações de SYBR[®] Green são apresentados no APÊNDICE B.

De acordo com a Figura 5.4a, para *W. viridescens*, as contagens de SYBR[®] Green qPCR foram superiores às de CP para todas as fases de cultivo. Os valores de exatidão relativa (Equação 5.2) variaram de 104% a 128%, o que correspondeu a diferenças entre as contagens de SYBR[®] Green qPCR e CP variando de -0,43 a -1,03 log₁₀ UFC/mL. Enquanto para *L. plantarum*, os valores de exatidão relativa variaram de 88 a 119%, o que correspondeu a diferenças entre as contagens de SYBR[®] Green qPCR e CP variando de 0,59 a -0,8 log₁₀ UFC/mL (Figura 5.4b).

Figura 5.4 - Quantificação de (a) *W. viridescens* e de (b) *L. plantarum*, ambas em cultura pura a 30 °C quantificadas por SYBR® Green qPCR e CP. A exatidão relativa (—) foi expressa como uma porcentagem das contagens em log₁₀ por SYBR® Green qPCR versus CP.

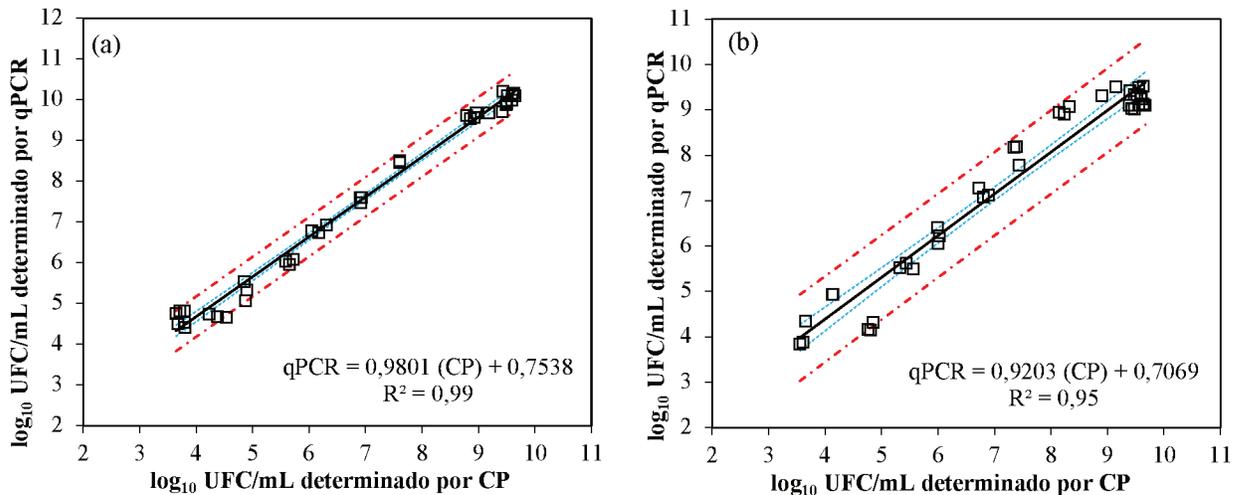


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A correlação entre os métodos foi avaliada por meio de análise de regressão (IC 95%), apresentada na Figura 5.5. A análise de regressão linear demonstrou uma forte correlação estatisticamente significativa entre CP e SYBR® Green qPCR para enumeração de *W. viridescens* ($R^2 = 0,99$; Figura 5.5a) e *L. plantarum* ($R^2 = 0,95$; Figura 5.5b). Um bom ajuste na regressão linear

é, frequentemente, aplicado para comparar dois métodos, mas a linearidade não implica, necessariamente, uma boa concordância (BUNCE, 2009; CLAIS et al., 2015).

Figura 5.5 - Análise de regressão linear dos valores \log_{10} UFC/mL obtidos pelo método CP e SYBR[®] Green qPCR para quantificação de (a) *W. viridescens* e (b) *L. plantarum*. Linhas pontilhadas azuis finas representam o intervalo de confiança de 95%, linhas pontilhadas vermelhas representam as bandas de predição de 95% e a equação linear da linha de tendência é representada pela linha contínua espessa.

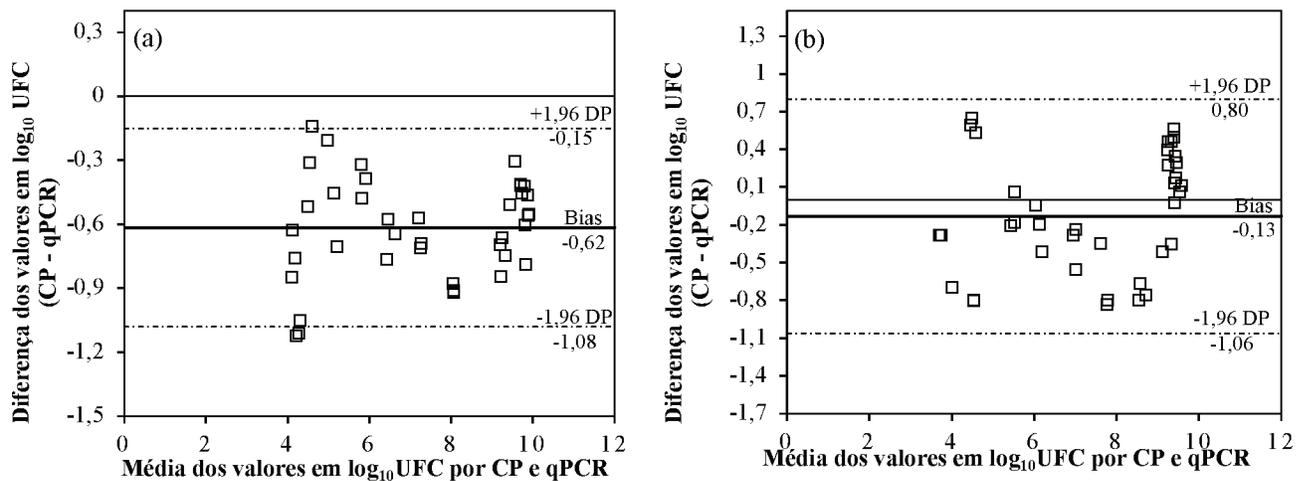


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Os gráficos de Bland-Altman foram construídos para verificar a concordância entre os métodos (Figura 5.6). Em geral, a maioria das contagens encontra-se dentro dos limites do intervalo de confiança de 95%. Os limites de concordância variaram entre -1,08 a -0,15 e entre -1,06 a 0,80 para *W. viridescens* e *L. plantarum*, respectivamente. Esses valores indicam que, por exemplo, os valores das contagens de *W. viridescens* obtidas por CP podem ser -1,08 abaixo das obtidas por qPCR. Em relação à média de diferenças entre as concentrações (\log_{10} UFC/mL; valor de Bias), um bias de -0,62 e de -0,13 para *W. viridescens* e *L. plantarum*, respectivamente, indica uma tendência de superestimação dos valores de qPCR em comparação ao método de CP. Esse fato pode ser explicado pela incapacidade do método de SYBR[®] Green qPCR de distinguir células vivas e mortas, já que o DNA de ambos os tipos de células é amplificado (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006). Uma hipótese para explicar esses resultados está na forma como as curvas-padrão foram construídas. Neste caso, a construção das curvas-padrão foi realizada a partir da diluição do DNA no último ponto da fase estacionária de crescimento, no qual pode conter uma

maior quantidade de células mortas, causando, assim, uma superestimação pelo método de qPCR. Estudos recentes também verificaram a concordância entre métodos convencionais e moleculares por meio da análise dos gráficos de Bland-Altman para quantificação de *Escherichia coli* de peles e carcaças de vitelo (LUEDTKE; BOSILEVAC, 2015), *Campylobacter jejuni* em amostras de aves (PAPIĆ et al., 2017) e quantificação de *Salmonella* Typhimurium em peito de frango (KIM et al., 2017).

Figura 5.6 - Análise de concordância dos valores de \log_{10} UFC/mL observados por CP e por SYBR[®] Green qPCR para (a) *W. viridescens* e (b) *L. plantarum* usando análise de Bland-Altman. A linha contínua em negrito representa o Bias (média), enquanto os desvios-padrão da diferença média de \log_{10} são representadas como linhas tracejadas. A linha fina contínua representa a linha zero. DP, desvio-padrão.

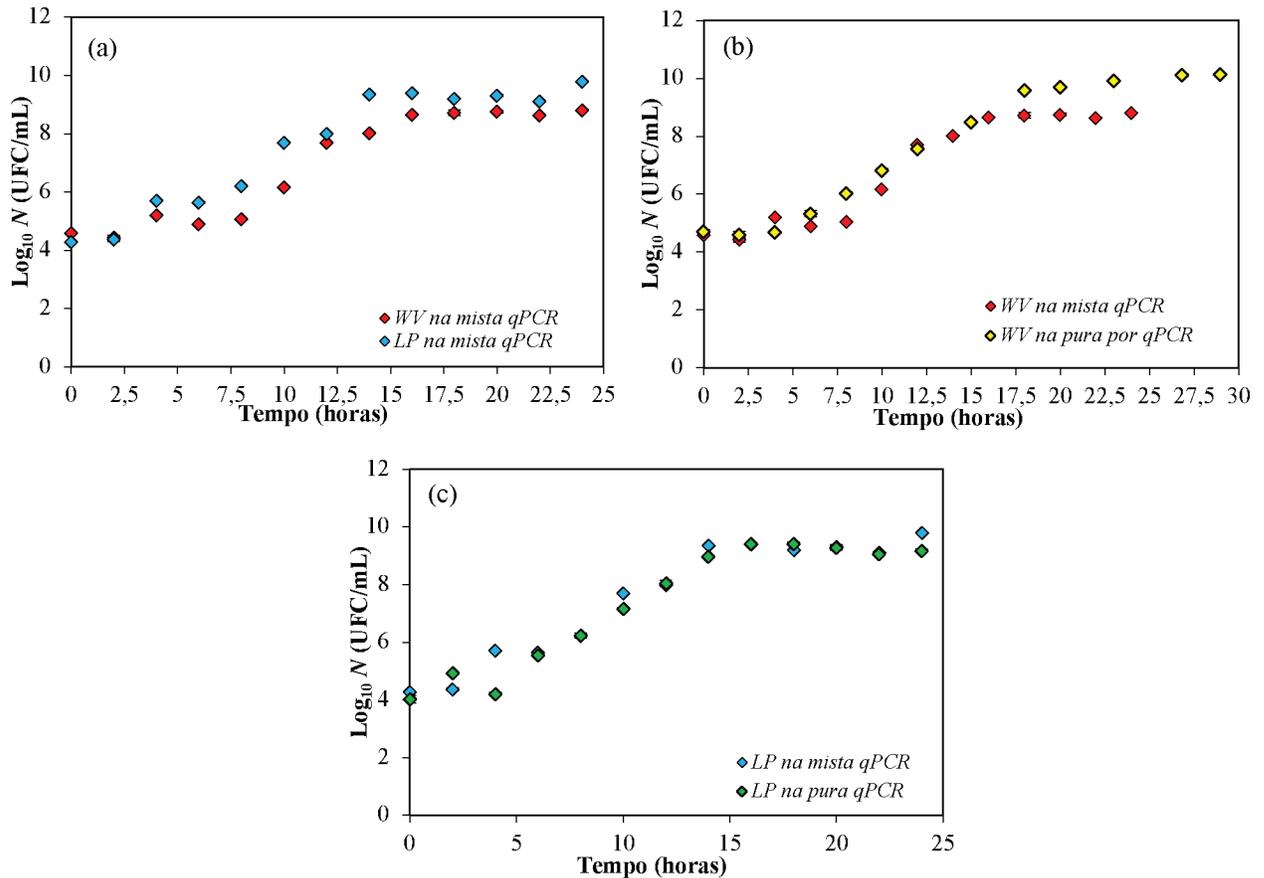


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

5.2.3.3 Estabelecimento das curvas de crescimento em cultura mista

O rendimento e a qualidade do DNA extraído da cultura mista a 30 °C, os valores de T_M e de C_T confirmaram a especificidade dos ensaios de SYBR[®] Green qPCR (APÊNDICE C). Na Figura 5.7 são apresentadas as curvas de crescimento da cultura mista de *W. viridescens* e de *L. plantarum* obtidas por SYBR[®] Green qPCR. Além disso, as curvas das culturas pura obtidas por SYBR[®] Green qPCR foram adicionadas para comparação do crescimento.

Figura 5.7 - Curvas de crescimento das culturas pura e mista de *W. viridescens* (WV) e de *L. plantarum* (LP) obtidas por SYBR® Green qPCR. (a) comparação das curvas de *W. viridescens* e *L. plantarum* em cultivo misto. (b) comparação das curvas de *W. viridescens* em cultura pura e mista. (c) comparação das curvas de *L. plantarum* em cultura pura e mista.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Ao confrontar o crescimento das duas espécies em cultura mista (Figura 5.7a), ambas as espécies não apresentaram crescimento até 2,5 h de cultivo. A partir de 4 h de incubação a 30 °C, ambas as espécies iniciam o crescimento, sendo que a cepa de *L. plantarum* atinge um crescimento superior até a fase estacionária (uma diferença de 0,98 log_{10} UFC/mL). No entanto, ao comparar as curvas de crescimento de *W. viridescens* em cultura mista e cultura pura determinadas por SYBR® Green qPCR (Figura 5.7b), pode-se notar que, na mesma condição de temperatura, *W. viridescens* cresceu bem em cultura pura com uma concentração de 10 log_{10} UFC/mL em 29 horas de cultivo. Enquanto para a espécie *L. plantarum*, o crescimento em cultura mista não foi

influenciado na presença de *W. viridescens*, uma vez que ambas as curvas apresentaram crescimento semelhante (Figura 5.7c) a 30 °C. No entanto, a temperatura pode influenciar o crescimento das espécies de BAL deteriorantes. De acordo com Camargo et al. (2018), a diminuição da temperatura de 30 °C para 4 °C aumentou a fase de latência apenas da espécie *L. plantarum*, em comparação às espécies *L. sakei* e *W. viridescens*. Esse fato destaca a importância de estudar a interação das BAL em temperaturas de refrigeração, que simulem condições reais de armazenamento de produtos cárneos, como será abordado no próximo item 6 desta tese.

Além dos resultados das concentrações obtidas por SYBR[®] Green qPCR, os perfis de pH foram determinados conforme descrito no item 5.2.4.1 e foram utilizados para avaliar a produção de ácidos por cada BAL em cultura pura e na cultura mista (APÊNDICE D). No final do cultivo, houve um decréscimo nos valores de pH, ou seja, um aumento da concentração de ácido láctico e a cultura mista apresentou menor valor de pH (pH = 3,51), seguido da cultura pura de *L. plantarum* (pH = 3,74) e de *W. viridescens* (pH = 3,91). Assim, o perfil de pH da cultura mista foi mais próximo da cultura pura de *L. plantarum*.

5.3 CONCLUSÕES

O limite de detecção do método de SYBR[®] Green qPCR foi de 3,7 log₁₀ UFC/mL de *W. viridescens* e 3,8 log₁₀ UFC/mL de *L. plantarum*. Quanto à curva-padrão de *L. plantarum*, testes adicionais devem ser realizados para melhorar sua eficiência que resultou em valor acima dos critérios estabelecidos (entre 90 a 110%). Esses testes não foram realizados devido à ausência de mais cepas como controle positivo e negativo para o teste de especificidade dos iniciadores projetados.

A partir das curvas-padrão foi possível quantificar a cinética do crescimento de *W. viridescens* e de *L. plantarum* em cultura pura e mista a 30 °C pelos métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR, que demonstraram uma boa correlação dentro do intervalo de confiança de 95%. No entanto, o teste de concordância demonstrou que os valores obtidos por SYBR[®] Green qPCR foram superestimados em comparação ao método de CP.

6. USO DOS MÉTODOS DE SYBR® Green qPCR E DE CONTAGEM EM PLACAS PARA CONSTRUÇÃO DE CURVAS DE CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* E DE *Leuconostoc mesenteroides* EM CULTURAS PURAS E MISTA

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Microrganismos

Cinco cepas diferentes da BAL *W. viridescens* e uma de *L. mesenteroides* foram utilizadas neste estudo, conforme listadas na Tabela 6.1. Duas cepas de referência foram fornecidas pela Coleção de Culturas do Tipo Espanhol (CECT) (Valência, Espanha). Quatro cepas de isolados alimentares foram coletadas de *morcillas* típicas da Espanha (DIEZ et al., 2009a; SANTOS et al., 2005b).

Tabela 6.1 - Cepas bacterianas usadas neste estudo.

Espécies	Identificação	Origem
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC 8293 ^T (CECT 219)	Azeitonas fermentadas
	ATCC 12706 ^T (CECT 283)	Produtos cárneos curados
<i>Weissella viridescens</i>	132 ^a	<i>Morcilla</i>
	W ₁ ^b	<i>Morcilla</i>
	W ₈ ^b	<i>Morcilla</i>
	W ₃₅ ^b	<i>Morcilla</i>

^TCepas tipo: ATCC, Coleção de Culturas Tipo Americana ou CECT, Coleção de Culturas do Tipo Espanhol.

^aCepas isoladas e identificadas por Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (RFLP) em estudo reportado por Santos et al. (2005b).

^bCepas isoladas e identificadas por RFLP em estudo reportado por Diez et al. (2009a).

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

As cepas identificadas por *W* foram isoladas a partir de diferentes tempos de armazenamento de *morcilla*, por exemplo, a cepa *W*₈ foi isolada após oito dias de armazenamento a 4 °C. Cada uma das seis cepas foi mantida, em caldo *Lactobacilli* MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) pH 6,5 (Difco™, Detroit, USA) e armazenadas em microtubos livres de DNases/RNases (Kasvi, Curitiba, Brasil) contendo 30% (V/V) de glicerol a -24 °C.

6.1.2 Cultivo do pré-inóculo

Para o preparo do pré-inóculo, 100 µL de cada cepa congelados foram reativados em tubos contendo 10 mL de caldo MRS, os quais foram incubados a 30 °C por 24 horas em estufa bacteriológica (Modelo 502, Fanem, São Paulo, Brasil) e uma subcultura foi realizada no dia seguinte, sob as mesmas condições. De acordo com testes preliminares (não mostrados), após esse período de incubação, a concentração de cada cepa de BAL, verificada por semeadura em superfície de ágar MRS, foi de, aproximadamente, 10^9 UFC/mL, correspondente à fase estacionária de crescimento.

Um coquetel com todas as cinco cepas de *W. viridescens* foi preparado ao misturar 1 mL de cada cepa na concentração 10^9 UFC/mL com 5 mL de caldo MRS para obter um pré-inóculo misto. Posteriormente, o pré-inóculo misto foi submetido a diluições seriadas em caldo MRS até a concentração final de, aproximadamente, 10^5 UFC/mL, confirmada por semeadura em ágar MRS.

6.1.3 Preparo e condições dos cultivos

6.1.3.1 Cultura pura

Os experimentos em cultura pura foram realizados em duplicata em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL com 200 mL de caldo MRS e com 2 mL do pré-inóculo misto (V/V), o qual foi previamente diluído na concentração de 10^5 UFC/mL, correspondendo à concentração inicial do experimento de, aproximadamente, 10^3 UFC/mL. As curvas de crescimento de *W. viridescens* foram avaliadas nas temperaturas isotérmicas de 4, 8, 14 e 30 °C, testadas para simular as diferentes condições de armazenamento de alimentos refrigerados. Por exemplo, as de 4 e 8 °C foram escolhidas com base em Audits International (1999) e Hassan e Dimassi (2014), respectivamente, que consideraram como as temperaturas médias dos refrigeradores domésticos. A temperatura de abuso moderada, 14 °C, foi escolhida com base em Rahman et al. (2005) e a temperatura de 30 °C foi utilizada como condição ótima de crescimento das BAL como descrito por Fusco et al. (2015).

Todas as curvas foram conduzidas até a fase estacionária de crescimento. As temperaturas foram registradas a cada cinco minutos por mini *data loggers* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha).

6.1.3.2 Cultura mista

O experimento em cultura mista foi realizado em duplicata em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 200 mL de caldo MRS, 1 mL do pré-inóculo misto (V/V) de *W. viridescens* (descrito no item 6.2.2) e 1 mL do pré-inóculo de *L. mesenteroides* (V/V). Ambos os pré-inóculos foram, previamente, diluídos na concentração 10^5 UFC/mL, correspondendo à concentração inicial do experimento de, aproximadamente, 10^3 UFC/mL. A curva de crescimento da cultura mista foi avaliada à temperatura isotérmica de refrigeração de 8 °C e conduzida até a fase estacionária de crescimento. A temperatura foi registrada a cada cinco minutos por mini *data loggers* (Testo 174, Lenzkirch, Alemanha).

6.1.4 Elaboração das curvas de crescimento

Em intervalos de tempo pré-determinados, dependendo da temperatura de incubação, 5 mL de cada cultivo foram, assepticamente, coletados em câmara de fluxo laminar (modelo CFLV-09, Veco, Campinas, Brasil) para determinação das concentrações (\log_{10} UFC/mL) da cultura pura de *W. viridescens* e da cultura mista de *W. viridescens* e *L. mesenteroides*. As concentrações de ambas as culturas foram determinadas por CP e por SYBR® Green qPCR.

6.1.4.1 Método de CP

As quantificações, realizadas em duplicata, foram obtidas por semeadura em superfície de ágar Lactobacilli MRS (Difco™, Detroit, USA). As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas, conforme o método preconizado pela *International Organization for Standardization* – ISO 15214:1998 (ANONYMOUS, 1998). Por este método foram realizadas as quantificações da cultura pura de *W. viridescens* e da contagem total das BAL (CTB), *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, em cultura mista, sem identificação da espécie.

6.1.4.2 Método de SYBR® Green qPCR

As amostras dos cultivos (2 mL) foram armazenadas a -24 °C em microtubos livres de DNases/RNases (Kasvi, Curitiba, Brasil) para posterior extração do DNA e preparo das reações de SYBR® Green qPCR, como descrito a seguir.

6.1.4.2.1 Extração do DNA

A partir desse estudo (Seção 6 da tese), o método de extração de DNA UltraClean® *Microbial DNA Isolation Kit* (Qiagen MOBIO Laboratories, Carlsbad, USA) utilizado no Seção 5 foi substituído pelo método GenElute™ Kit (Bacterial Genomic DNA Kit). O DNA foi extraído de 2 mL da cultura bacteriana, de acordo com as recomendações do fabricante para bactérias Gram-positivas. O DNA extraído foi suspenso em 200 µL de tampão recomendado e quantificado em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ ND-1000 (Wilmington, Delaware, USA). A qualidade do DNA foi avaliada como descrito no item 5.2.3.1.

6.1.4.2.2 Iniciadores

Os iniciadores utilizados para a amplificação específica da cepa de *W. viridescens* estão descritos no item 5.2.3.2 da Seção 5. Para a quantificação de *L. mesenteroides*, foi utilizado o par de iniciadores do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), o qual amplifica um fragmento de 886 pb (PETRI et al., 2013). Os iniciadores foram: SCAR-LEU-F (GTGGTCATGGGTCTTAGC) e SCAR-LEU-R (GGATCAAGACTAGCCAATG).

6.1.4.2.3 Condições de ciclagem do SYBR® Green qPCR

No desenvolvimento desta seção, executou-se o método de SYBR® Green qPCR no equipamento Real Time Rotor-Gene Q® (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland), no Núcleo de Microbiologia de Alimentos do Laboratório de Ciências e Tecnologia de Alimentos – CCA/UFSC,

usando o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, USA).

As condições de ciclagem para a quantificação específica de *W. viridescens* estão descritas no item 5.2.3.4 da Seção 5. As condições de ciclagem para a quantificação de *L. mesenteroides* foram aplicadas conforme descrito por Petri et al. (2013), com adaptações realizadas por Severo (2018). 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. Adicionou-se água livre de RNase a fim de se obter um volume final de 20 µL. Todas as reações foram executadas em triplicata, 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 72 °C. Após as amplificações completas, uma análise de *melting* foi realizada para confirmar a especificidade dos iniciadores, conforme descrito no item 5.2.4.3 da Seção 5. A especificidade dos iniciadores para *L. mesenteroides* foi confirmada com as cepas listadas na Tabela 5.1 da Seção 5.

6.1.4.2.4 Construção das curvas-padrão

As curvas-padrão foram construídas ao se plotar os valores médios de C_T de três execuções de SYBR® Green qPCR de dois experimentos independentes (duplicata da extração) em função do logaritmo das concentrações em UFC determinadas por CP e previamente diluídas. A partir desse valor, os valores em \log_{10} UFC/mL de cada diluição seriada foram considerados constantes para a construção da curva-padrão. Cada curva-padrão foi repetida em ensaios de qPCR independentes e em dias diferentes. Os valores de C_T foram estimados pela réplica de extração de DNA da cultura pura coletado no primeiro ponto da fase estacionária de crescimento a fim de se evitar as células não viáveis (SEVERO, 2018), para cada temperatura estudada, que foi diluído em água *Milli-Q*.

Os valores de LoD e de LoQ foram determinados conforme descrito no item 5.1.4.3.5 da Seção 5. O limiar foi determinado por meio da função *Auto-Find Threshold* do Rotor-Gene Q®, a qual ajusta uma faixa de níveis de limiar para obter o melhor resultado da curva-padrão. As eficiências das curvas-padrão foram determinadas mediante a Equação 5.1 descrita no item 5.2.3.5 da Seção 5.

Para a quantificação de *L. mesenteroides* na cultura mista, a curva-padrão de qPCR construída para a temperatura de 8 °C ($R^2 = 0,99$ e Eficiência = 100%) elaborada por Severo (2018) foi utilizada nesse trabalho, conforme a Equação 6.1.

$$C_T = -3,32 \times (\text{Log}_{10} \text{ UFC/mL}) + 37,73 \quad (6.1)$$

6.1.5 Análise comparativa dos métodos

A comparação dos resultados obtidos pelo método de CP aos do SYBR[®] Green qPCR foi realizada por análise de regressão linear por intermédio da técnica de Passing-Bablok (PASSING; BABLOK, 1983), calculada pelo MedCalc 17.1 (MedCalc[®] Software, Bélgica) com um nível de significância de $p < 0,0001$ e um intervalo de confiança (IC) de 95%. Os limites de concordância entre os dois métodos foram avaliados pelo de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1986). Os gráficos de Bland-Altman foram gerados por meio do GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Prism[®] Software, USA).

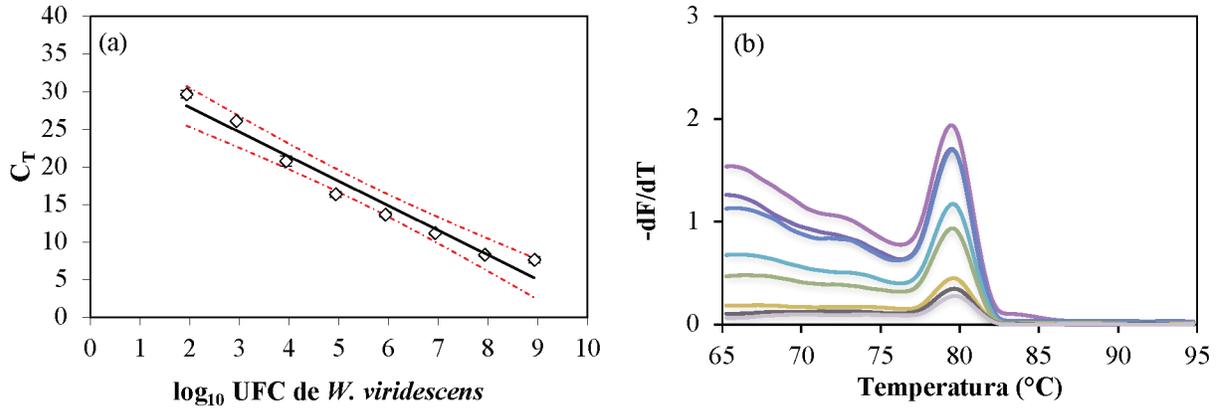
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Curvas-padrão de SYBR[®] Green qPCR

De acordo com as Informações Mínimas para Publicação de Experimentos Quantitativos de qPCR (BUSTIN et al., 2009), foram fornecidos, neste estudo, dados sobre o desempenho do protocolo de SYBR[®] Green qPCR. A especificidade dos iniciadores *recN*, quando testados contra uma coleção de bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pseudomonas*, como não alvo e seis espécies de *W. viridescens* de diferentes fontes, como bactérias alvo (controle positivo) (Tabela 5.2 da Seção 5), demonstra que eles podem ser usados para detecção e quantificação específica de *W. viridescens* quando utilizados com a metodologia SYBR[®] Green, o que torna desnecessária a síntese de uma sonda TaqMan[™], como proposto anteriormente por Gómez-Rojo et al. (2015).

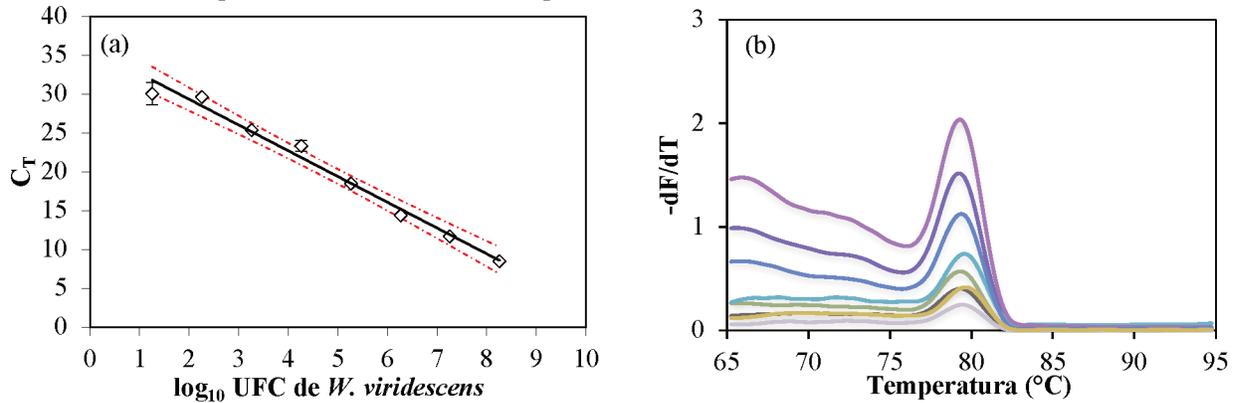
Nas Figuras 6.1 a 6.4, estão representados os valores de C_T versus a concentração de células (\log_{10} UFC/mL) de *W. viridescens* cultivadas a 4, 8, 14 e 30 °C, respectivamente.

Figura 6.1 – (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de *W. viridescens* em meio de cultivo na temperatura de 4 °C e (b) curva de *melting* para as diluições em série do coquetel de *W. viridescens*, com uma T_M de $79,69 \pm 0,05$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.



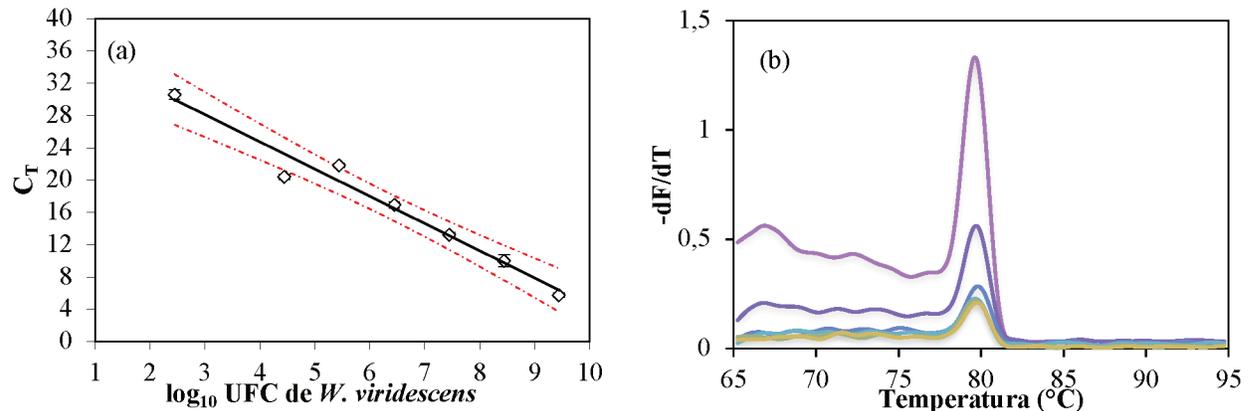
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 6.2 - (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de *W. viridescens* em meio de cultivo na temperatura de 8 °C e (b) curva de *melting* para as diluições em série do coquetel de *W. viridescens*, com uma T_M de $79,37 \pm 0,09$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.



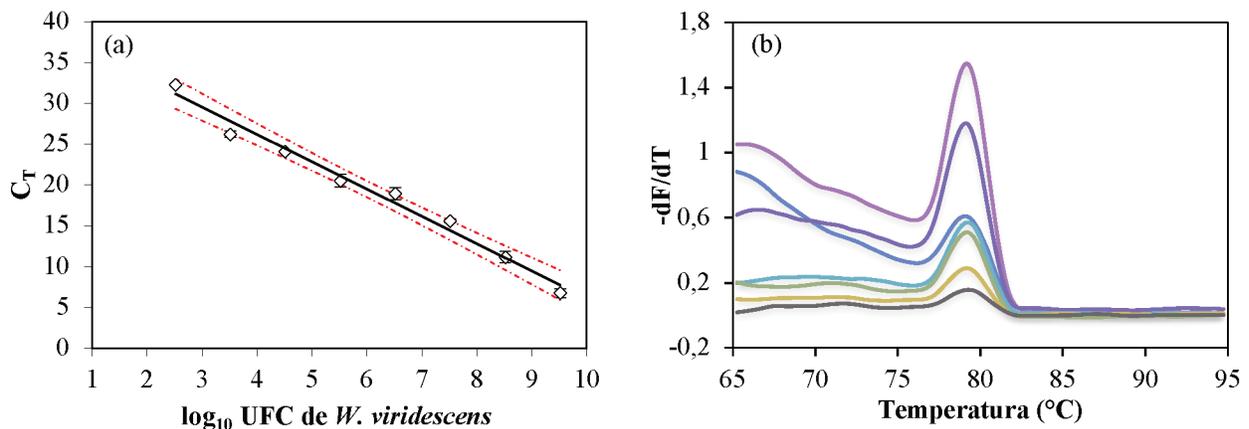
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 6.3 - (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de *W. viridescens* em meio de cultivo na temperatura de 14 °C e (b) curva de *melting* para as diluições em série do coquetel de *W. viridescens*, com uma T_M de $79,66 \pm 0,09$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 6.4 - (a) Curva-padrão obtida para um coquetel de *W. viridescens* em meio de cultivo na temperatura de 30 °C e (b) curva de *melting* para as diluições em série do coquetel de *W. viridescens*, com uma T_M de $79,18 \pm 0,06$ °C. As barras de erro representam o desvio-padrão. A linha em negrito representa o ajuste linear e as linhas pontilhadas em vermelho representam as bandas do IC 95%.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Na Figura 6.1a, a quantificação foi considerada específica até um valor de C_T de $29,64 \pm 0,50$, correspondendo a um LoD de $1,93 \log_{10}$ UFC/mL ou $8,5 \times 10^1$ UFC/mL, para a temperatura de 4 °C. Já na Figura 6.2a, a curva-padrão construída a partir dos valores de C_T versus a concentração de células (\log_{10} UFC/mL) de *W. viridescens* cultivada a 8 °C foi considerada

específica até um valor de C_T de $30,09 \pm 1,44$, correspondendo a um LoD de $1,26 \log_{10}$ UFC/mL ou $1,8 \times 10^1$ UFC/mL. Na Figura 6.3a (curva-padrão a 14°C), a quantificação foi considerada específica até um valor de C_T de $30,59 \pm 0,60$, correspondendo a um LoD de $2,45 \log_{10}$ UFC/mL ou $2,8 \times 10^2$ UFC/mL. Enquanto na Figura 6.4a, construída a partir dos valores de C_T versus a concentração de células (\log_{10} UFC/mL) de *W. viridescens* cultivada a 30°C , a quantificação foi considerada específica até um valor de C_T de $32,27 \pm 0,08$, correspondendo a um LoD de $2,52 \log_{10}$ UFC/mL ou $3,3 \times 10^2$ UFC/mL.

As correlações dos valores de C_T versus a concentração de células (\log_{10} UFC/mL) de *W. viridescens* obtidas para as temperaturas de 4, 8, 14 e 30°C são representadas pelas Equações 6.2, 6.3, 6.4 e 6.5, respectivamente.

$$C_T = -3,27 \times (\log_{10} \text{ UFC/mL}) + 34,43 \quad (6.2)$$

$$C_T = -3,31 \times (\log_{10} \text{ UFC/mL}) + 36,39 \quad (6.3)$$

$$C_T = -3,37 \times (\log_{10} \text{ UFC/mL}) + 38,21 \quad (6.4)$$

$$C_T = -3,34 \times (\log_{10} \text{ UFC/mL}) + 39,59 \quad (6.5)$$

A relação linear ($R^2 = 0,96$) determinada ao longo de um intervalo de $7 \log_{10}$ UFC/mL, de 1,93 a $8,93 \log_{10}$ UFC/mL, indica uma eficiência de 102% de acordo com a Equação 6.2, considerando a inclinação da reta (-3,27) para a temperatura de 4°C . Já para a temperatura de 8°C , a curva-padrão apresentou valor de $R^2 = 0,98$, com uma relação linear determinada ao longo de um intervalo de $7 \log_{10}$ UFC/mL, de 1,26 a $8,26 \log_{10}$ UFC/mL, indicando uma eficiência de 101% de acordo com a Equação 6.3, considerando a inclinação da reta (-3,31). A relação linear ($R^2 = 0,97$) determinada ao longo de um intervalo de $7 \log_{10}$ UFC/mL, de 2,45 a $9,45 \log_{10}$ UFC/mL, indica uma eficiência de 98% de acordo com a Equação 6.4, considerando a inclinação da reta (-3,37) para a temperatura de 14°C . Já para a temperatura de 30°C , a curva-padrão apresentou valor de $R^2 = 0,98$, com uma relação linear determinada ao longo de um intervalo de $7 \log_{10}$ UFC/mL, de 2,52 a $9,52 \log_{10}$ UFC/mL, indicando uma eficiência de 99% de acordo com a Equação 6.5, considerando a inclinação da reta (-3,34).

Para métodos desenvolvidos usando SYBR[®] Green, a temperatura de *melting* (T_M) forma, em conjunto com o valor de C_T , parâmetros adicionais que precisam ser considerados para avaliar

a especificidade do método (BROEDERS et al., 2014). A T_M do produto de amplificação obtido durante o teste de especificidade, utilizando as mesmas condições de análise, deve situar-se dentro do intervalo nominal $T_M \pm 1$ °C para ser considerado específico (BROEDERS et al., 2013). Com isso, a especificidade para a construção das curvas-padrão foi confirmada com a análise das curvas de *melting* (Figuras 6.1b a 6.4b), em que uma única T_M foi verificada para as diferentes diluições (representada pelos picos de *melting*), correspondendo as T_M de $79,69 \pm 0,05$ °C, de $79,37 \pm 0,09$ °C, de $79,66 \pm 0,09$ °C e de $79,18 \pm 0,06$ °C para as curvas-padrão construídas em meio de cultura a 4, 8, 14 e 30 °C, respectivamente.

De acordo com Berdal e Holst-Jensen (2001), o valor de LoD é de 5 a 10 vezes menor do que o LoQ em amostras complexas. Como as curvas-padrão apresentadas anteriormente foram obtidas a partir de um coquetel de cepas de diferentes condições fisiológicas, os valores de LoQ foram estabelecidos em $8,5 \times 10^2$ UFC/mL, $1,8 \times 10^3$ UFC/mL, $2,8 \times 10^3$ UFC/mL e $3,3 \times 10^3$ UFC/mL de *W. viridescens* cultivada nas temperaturas de 4, 8, 14 e 30 °C, respectivamente. É uma gama adequada para quantificação de BAL deteriorantes, uma vez que essas podem estar presentes na microbiota inicial de carnes e produtos cárneos na faixa de 10 a 10^3 UFC/g (PARENTE; GRIECO; CRUDELE, 2001; KOUTSOUMANIS et al., 2006; SLONGO et al., 2009; KAMENÍK, 2015). No entanto, faz-se uma suposição dos resultados obtidos em meio de cultivo (em volume) extrapolados para um produto cárneo (em massa). Porém, esse contexto será abordado na Seção 8 onde um produto cárneo foi utilizado para determinação dos valores de LoD e LoQ de BAL por TaqMan™ qPCR.

6.2.2 Quantificação de *W. viridescens* por SYBR® Green qPCR e por CP em cultura pura

As medidas dos valores de C_T obtidos nas reações de SYBR® Green qPCR foram transformadas em concentrações, por meio das respectivas equações das curvas-padrão para cada temperatura. Os resultados das concentrações celulares (\log_{10} UFC/mL) de *W. viridescens* cultivada nas temperaturas de 4, 8, 14 e 30 °C até a fase estacionária de crescimento, estimadas por CP e por SYBR® Green qPCR são apresentados na Tabela 6.2.

Quando são comparadas as contagens obtidas por CP e por qPCR, uma exatidão relativa média de 100% indica total concordância entre os dois métodos (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al.,

2004). Os valores de exatidão relativa obtidos no presente estudo para as contagens de *W. viridescens* em meio de cultivo (Tabela 6.2) variaram entre 90 e 104% para a curva de crescimento a 4 °C, entre 92 e 110% para a curva de crescimento a 8 °C, entre 84 e 109% para a curva de crescimento a 14 °C e entre 94 e 109% para a curva de crescimento a 30 °C. Esses valores apresentam menor variação do que os relatados em vários estudos para outras bactérias (MAMLOUK et al., 2012; PENNACCHIA; ERCOLINI; VILLANI, 2009) e semelhantes aos obtidos por Rodríguez-Lázaro et al. (2004) para a quantificação de *Listeria monocytogenes* (de 89 a 116%) e aos obtidos por Martín et al. (2006) para quantificação de *L. sakei* em salsichas fermentadas (de 91 a 98%).

Tabela 6.2 - Valores das concentrações (\log_{10} UFC/mL) do coquetel de *W. viridescens* cultivada a 4, 8, 14 e 30 °C obtidas por CP e SYBR® Green qPCR e sua exatidão relativa.

Tempo (horas)	CP (\log_{10} UFC/mL) ^a	Valores de C_T ^b	SYBR® Green qPCR (\log_{10} UFC/mL) ^c	Exatidão relativa (%) ^d
Temperatura de 4 °C ($\pm 0,2$ °C)				
0	3,31 \pm 0,01	27,48 \pm 1,07	3,10 \pm 0,00	94
78	3,30 \pm 0,00	27,51 \pm 1,01	3,25 \pm 0,12	99
127	3,93 \pm 0,00	24,62 \pm 0,63	3,96 \pm 0,00	101
194	4,23 \pm 0,13	24,57 \pm 0,40	4,21 \pm 0,17	100
271	4,80 \pm 0,07	23,2 \pm 0,19	4,31 \pm 0,06	90
362	5,38 \pm 0,18	18,95 \pm 0,36	5,60 \pm 0,05	104
461	6,55 \pm 0,08	16,39 \pm 0,25	6,39 \pm 0,03	98
536	7,12 \pm 0,06	14,34 \pm 0,32	6,99 \pm 0,05	98
607	7,64 \pm 0,13	12,04 \pm 0,01	7,54 \pm 0,15	99
702	8,65 \pm 0,03	8,76 \pm 0,12	8,46 \pm 0,20	98
773	8,72 \pm 0,03	10,03 \pm 0,33	8,36 \pm 0,00	96
847	8,94 \pm 0,06	8,67 \pm 0,06	8,65 \pm 0,08	97
Temperatura de 8 °C ($\pm 0,2$ °C)				
0	3,48 \pm 0,07	23,07 \pm 0,12	3,83 \pm 0,00	110
24	3,55 \pm 0,09	22,99 \pm 1,05	3,32 \pm 0,37	94
55	4,24 \pm 0,02	22,77 \pm 0,64	4,11 \pm 0,00	97
79	4,85 \pm 0,04	21,22 \pm 0,12	4,58 \pm 0,00	95
103	5,45 \pm 0,08	19,82 \pm 0,39	5,01 \pm 0,00	92
152	6,76 \pm 0,11	12,14 \pm 0,52	6,47 \pm 0,44	96
175	7,07 \pm 0,05	9,85 \pm 0,11	7,27 \pm 0,37	103
199	7,78 \pm 0,16	7,64 \pm 0,61	8,30 \pm 0,10	107
223	8,39 \pm 0,06	5,95 \pm 0,06	8,56 \pm 0,28	102
263	9,24 \pm 0,07	7,49 \pm 0,14	8,49 \pm 0,00	92
288	9,24 \pm 0,06	6,74 \pm 0,03	8,82 \pm 0,07	95
319	9,39 \pm 0,05	6,56 \pm 0,09	8,80 \pm 0,02	94
341	9,13 \pm 0,04	6,70 \pm 0,07	8,84 \pm 0,08	97
Temperatura de 14 °C ($\pm 0,2$ °C)				
0	3,16 \pm 0,01	28,18 \pm 0,02	2,98 \pm 0,01	94
8	3,96 \pm 0,11	23,10 \pm 0,50	3,43 \pm 0,11	87
15	4,59 \pm 0,08	26,66 \pm 0,36	3,83 \pm 0,11	84
25	5,09 \pm 0,09	25,30 \pm 0,36	4,49 \pm 0,15	88
39	6,38 \pm 0,06	18,26 \pm 1,56	5,92 \pm 0,00	93
49	7,22 \pm 0,01	11,90 \pm 0,01	7,81 \pm 0,00	108
56	7,75 \pm 0,11	9,86 \pm 0,36	8,41 \pm 0,10	109
71	8,76 \pm 0,01	8,00 \pm 0,24	8,97 \pm 0,07	102
80	9,43 \pm 0,08	9,26 \pm 0,12	8,59 \pm 0,03	91
97	9,34 \pm 0,10	7,23 \pm 0,13	9,20 \pm 0,04	98
103	9,36 \pm 0,13	7,30 \pm 0,03	9,17 \pm 0,01	98

Tabela 6.2 – Valores das concentrações (\log_{10} UFC/mL) do coquetel de *W. viridescens* cultivada a 4, 8, 14 e 30 °C obtidas por CP e SYBR® Green qPCR e sua exatidão relativa.

(continuação)

Tempo (horas)	CP (\log_{10} UFC/mL) ^a	Valores de C_T ^b	SYBR® Green qPCR (\log_{10} UFC/mL) ^c	Exatidão relativa (%) ^d
Temperatura de 30 °C ($\pm 0,2$ °C)				
0	3,29 \pm 0,04	27,99 \pm 0,16	3,47 \pm 0,05	105
3	4,00 \pm 0,04	27,00 \pm 0,40	3,76 \pm 0,12	94
5	5,39 \pm 0,10	19,88 \pm 0,35	5,89 \pm 0,10	109
8	7,04 \pm 0,00	13,77 \pm 1,39	7,71 \pm 0,41	110
10	8,25 \pm 0,00	9,44 \pm 0,39	9,01 \pm 0,12	109
13	9,29 \pm 0,03	6,88 \pm 0,01	9,01 \pm 0,00	97
15	9,43 \pm 0,00	6,13 \pm 0,36	9,77 \pm 0,08	104
18	9,52 \pm 0,04	6,35 \pm 0,24	10,0 \pm 0,04	105
20	9,43 \pm 0,22	6,07 \pm 0,12	9,83 \pm 0,03	104

^aMédia e desvio-padrão das contagens em placa.

^bMédia e desvio-padrão dos valores de C_T das reações realizadas em duplicatas (dois experimentos independentes, réplicas técnicas).

^cMédia e desvio-padrão dos valores de \log_{10} UFC/mL determinados utilizando as curvas-padrão de SYBR® Green qPCR.

^dGrau de correspondência entre os resultados obtidos com o método CP e com o método de SYBR® Green qPCR. A exatidão relativa é expressa como a porcentagem de números de \log_{10} UFC/mL calculada pelo método de SYBR® Green qPCR versus o método de CP.

Todas as amostras que apresentaram \log_{10} UFC/mL médio abaixo do limite de quantificação para cada temperatura, são mostradas em barra cinza.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Reunindo todos os resultados expressos na Tabela 6.2, as contagens do crescimento obtidas do método de CP e SYBR® Green qPCR parecem bastante próximos, considerando o desvio-padrão. Na maioria dos casos, as diferenças entre as contagens obtidas por CP e SYBR® Green qPCR ao longo do crescimento foram menores no início do cultivo, mas essas diferenças aumentaram principalmente na fase estacionária. Porém, todas as contagens estavam dentro dos LoDs aceitáveis para cada temperatura. Apesar de algumas dessas contagens estarem abaixo dos LoQs de 3,45 e 3,52 \log_{10} UFC/mL para as temperaturas de 14 °C e 30 °C, respectivamente, estabelecidos nesse trabalho. Além disso, apenas durante a fase estacionária do cultivo a 30 °C, as contagens por SYBR® Green qPCR foram maiores em comparação a CP. Pode-se supor que, à medida que o estresse aumenta, parte das bactérias foram transformadas no estado VBNC ou morreram, o que explica uma superestimação observada por SYBR® Green qPCR, como já foi abordado por Reichert-Schwillinsky et al. (2009) na quantificação de *L. monocytogenes* por qPCR e CP. As diferenças relacionadas ao crescimento entre dados de CP e de qPCR também foram

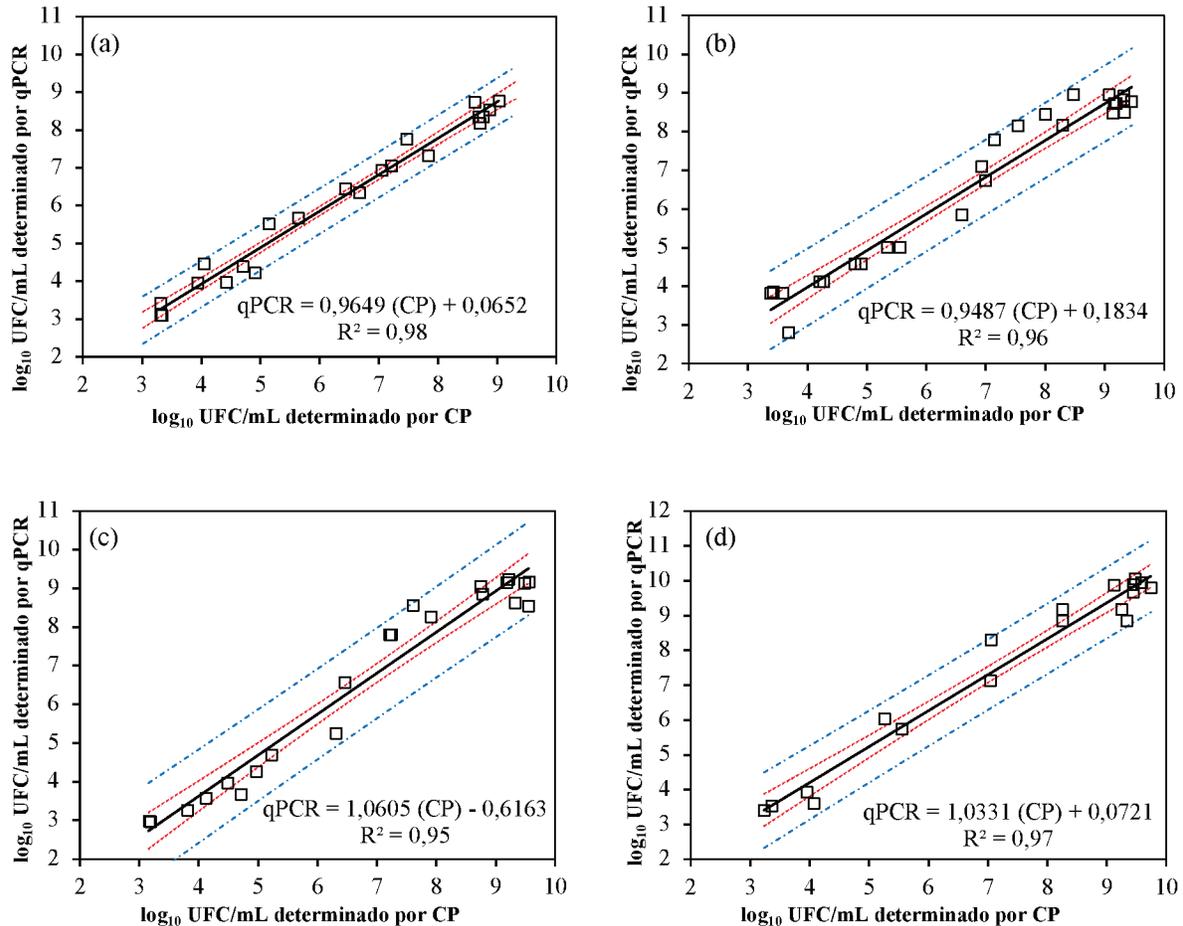
relatadas para *Escherichia coli* e foram atribuídas a alterações no conteúdo de DNA das células, diferenças na resistência à lise e à acessibilidade do DNA alvo (LUDWIG; SCHLEIFER, 2000).

Outra implicação importante dos resultados é que as curvas-padrão de quantificação por qPCR relacionadas ao número de \log_{10} UFC/mL determinados na cultura usada para o isolamento do DNA podem adicionar uma superestimação por qPCR, dependendo do estado fisiológico da população bacteriana presente na cultura (REICHERT-SCHWILLINSKY et al., 2009). Para evitar essa superestimação, uma nova abordagem para a construção das curvas-padrão foi realizada nesse estudo. Utilizou-se a diluição do DNA da cultura coletada no início da fase estacionária de crescimento, evitando quantidades de células mortas ou estressadas, o que pode explicar uma maior semelhança entre as contagens por SYBR[®] Green qPCR e por CP.

6.2.2.1 Correlação e concordância entre os métodos

A correlação entre os métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR foi avaliada por meio de análise de regressão (IC 95%), representada na Figura 6.5. A análise de regressão linear demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre CP e SYBR[®] Green qPCR para enumeração de um coquetel de *W. viridescens* cultivado a 4 °C ($R^2 = 0,98$; Figura 6.5a), 8 °C ($R^2 = 0,96$; Figura 6.5b), 14 °C ($R^2 = 0,95$; Figura 6.5c) e 30 °C ($R^2 = 0,97$; Figura 6.5d). No geral, as curvas de correlação apresentaram valores de R^2 maiores que os coeficientes de correlação relatados para vários métodos de qPCR aplicados a amostras de carnes ou frutos do mar (valores de R^2 variando de 0,884 a 0,895) (JOSEFSEN et al., 2010; REYNISSON et al., 2008; MAMLOUK et al., 2012). Isso confirma a confiabilidade do novo protocolo de SYBR[®] Green qPCR obtido nesse trabalho, dedicado à quantificação de um coquetel de diferentes cepas de *W. viridescens*. Um bom ajuste na regressão linear é, frequentemente, aplicado para comparar dois métodos, mas a linearidade não implica, necessariamente, uma boa concordância (BLAND; ALTMAN, 1986; BUNCE, 2009; CLAIS et al., 2015).

Figura 6.5 - Análise de regressão linear dos valores de \log_{10} UFC/mL observados por CP e por SYBR[®] Green qPCR nas temperaturas de (a) 4 °C, (b) 8 °C, (c) 14 °C e (d) 30 °C. Correlação entre CP e SYBR[®] Green qPCR para quantificação de um coquetel de *W. viridescens*. Linhas pontilhadas vermelhas finas representam o intervalo de confiança de 95%, linhas pontilhadas azuis representam as bandas de predição de 95% e a equação linear da linha de tendência é representada pela linha contínua espessa.

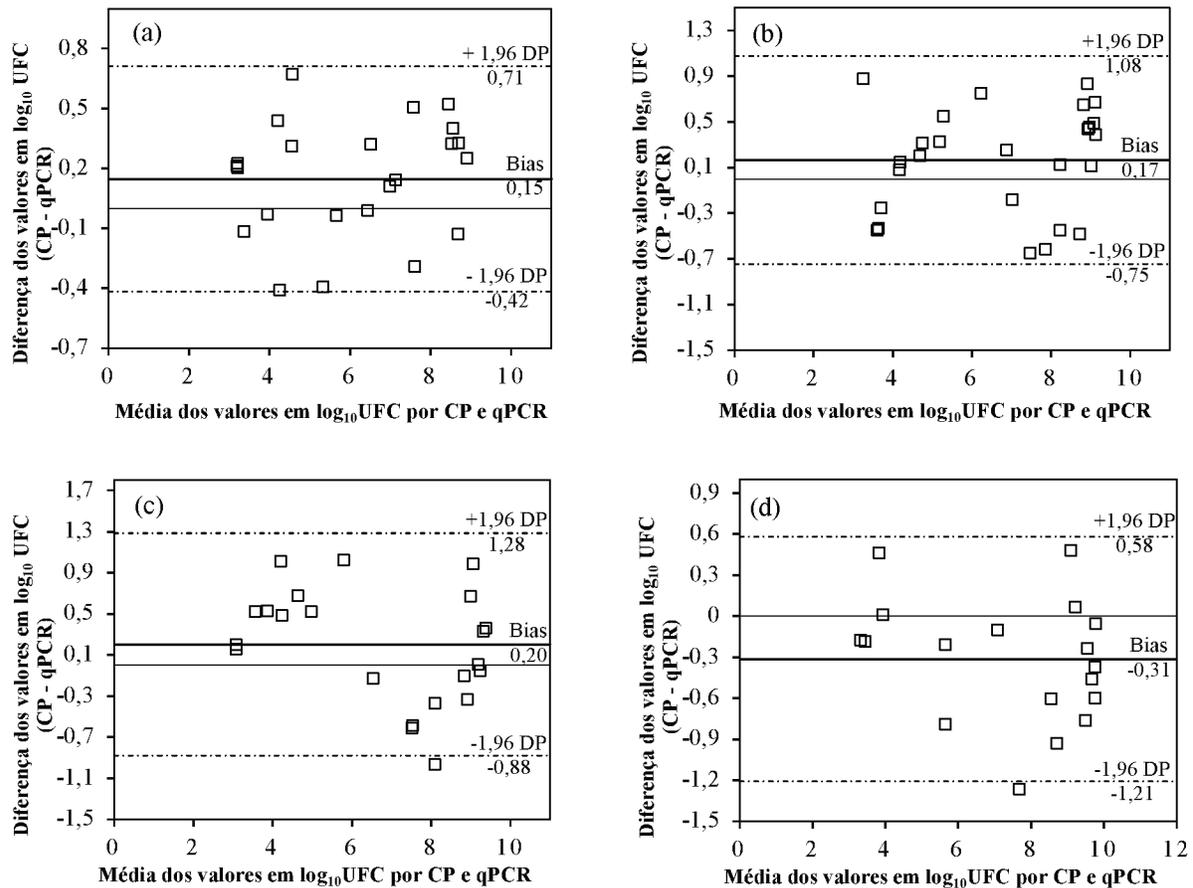


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Para verificar a concordância entre os métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR, foram construídos os gráficos de Bland-Altman (Figura 6.6). Em geral, a maioria das contagens está dentro dos limites do intervalo de confiança de 95%. Os limites de concordância (diferença entre os valores em \log_{10} UFC/mL (CP - qPCR)) variaram entre -0,42 a 0,71 para as curvas de crescimento a 4 °C, entre -0,75 a 1,08 para as curvas de crescimento a 8 °C, entre -0,88 a 1,28 para as curvas de crescimento a 14 °C e entre -1,21 a 0,58 para as curvas de crescimento a 30 °C. Em relação à média de diferenças entre as concentrações (\log_{10} UFC/mL; valor de *Bias*), foi observado

uma tendência de igualdade ao comparar CP e SYBR® Green qPCR (diferença = 0; Figura 6.6), com valores de *Bias* (\log_{10} UFC/mL (CP - qPCR)) de 0,15, 0,17, 0,20 e -0,31 \log_{10} UFC/mL para os cultivos realizados a 4, 8, 14 e 30 °C, respectivamente. Esses valores são inferiores ao valor de tendência aceito de 0,5 a 0,8 \log_{10} para contagens em placas em matrizes sólidas (AFSSA, 2008). Assim, esse método pode ser utilizado para quantificação de um coquetel de *W. viridescens*, apesar da incapacidade de distinguir as células vivas das mortas, posto que o DNA é amplificado em ambas (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006). No entanto, o método de CP, considerado o padrão-ouro para a avaliação da viabilidade dos microrganismos (CHAMPAGNE et al., 2011), também tem limitações, pois detecta apenas a fração cultivável de populações microbianas (JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008) e as células "viáveis, mas não cultiváveis" são perdidas (OLIVER, 2005). Além disso, uma UFC pode ser derivada de mais de uma única célula bacteriana, conforme já explicado por Postollec et al. (2011).

Figura 6.6 - Análise de concordância dos valores de \log_{10} UFC/mL observados por CP e por SYBR[®] Green qPCR nas temperaturas de (a) 4 °C, (b) 8 °C, (c) 14 °C e (d) 30 °C. Concordância entre os métodos CP e SYBR[®] Green qPCR para quantificação de *W. viridescens* usando análise de Bland-Altman. A linha contínua em negrito representa a tendência (média), enquanto os desvios-padrão da diferença média de \log_{10} são representadas como linhas tracejadas. A linha fina contínua representa a linha zero. DP, desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

6.2.3 Quantificação do crescimento *W. viridescens* e *L. mesenteroides* por SYBR[®] Green qPCR e por CP em cultura mista

As espécies do gênero *Weissella* são difíceis de identificar por meio de métodos fenotípicos. Além disso, é particularmente discutível a diferenciação entre *Weissella* spp., *Lactobacillus* spp. heterofermentativas e *Leuconostoc* spp. (COLLINS et al., 1993). O emprego de metodologias rápidas para a identificação e/ou a quantificação dessas bactérias está se tornando uma questão muito importante em microbiologia, por permitir o conhecimento da bactéria

predominante na deterioração, tornando-se essencial para a indústria de alimentos poder trabalhar para aumentar a vida útil de produtos cárneos (RICCHI et al., 2017). Assim, alguns protocolos de qPCR já foram propostos para a quantificação de bactérias nesses produtos, por exemplo para a quantificação de *W. viridescens* em *morcilla* (GÓMEZ-RÓJO et al., 2015), de *L. mesenteroides* em fiambre (ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008) e de *L. sakei* em salsichas (MARTÍN et al., 2006). Além disso, várias técnicas foram desenvolvidas para descrever os perfis microbianos de deterioração de alimentos. O pirosequenciamento baseado no gene *16S rRNA* é capaz de caracterizar a diversidade microbiana, mas não de determinar a quantidade, importante para a avaliação da segurança de alimentos (CAO et al., 2017; LIANG; PARK; YOON, 2016).

Para estabelecer um protocolo rápido e confiável para a avaliação de microrganismos importantes na deterioração de produtos cárneos, o método de SYBR[®] Green qPCR proposto nesse trabalho foi aplicado para identificar e quantificar o coquetel de cepas de *W. viridescens* em cultura mista com *L. mesenteroides* cultivadas a 8 °C, simulando uma temperatura real de armazenamento em refrigeradores domésticos. Importante enfatizar que a espécie *L. mesenteroides* também foi descrita por diversos autores como uma das principais BAL responsáveis pela deterioração de produtos cárneos cozidos e embalados a vácuo como presunto e *morcilla*, devido ao seu rápido crescimento e a sua capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração (DIEZ et al., 2009c; COMI; IACUMIN, 2012).

Espécies de *Leuconostoc* spp. apresentam muitas características fenotípicas e têm necessidades de crescimento complexas, o que dificulta a sua identificação por testes fenotípicos. Embora essas características tenham fornecido a base clássica para a diferenciação de espécies, a análise filogenética baseada na sequência do gene *16S rRNA* tem sido usada para refinar a diferenciação de espécies (ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008; MATSUKI et al., 2002). Paran e Michelmore (1993) desenvolveram uma técnica para converter marcadores do tipo RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) nas chamadas regiões amplificadas caracterizadas por sequência (*SCARs*). Desde então, os marcadores *SCAR* são, frequentemente, usados para identificação específica de espécies ou de linhagens (ISENEGGER et al., 2003; SOLIERI; GIUDICI, 2010; PETRI et al., 2013). Assim, um teste adicional da especificidade dos iniciadores *SCAR* propostos por Petri et al. (2013) para identificação e quantificação de *L. mesenteroides* foi realizado (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Teste de especificidade para os pares de iniciadores *SCAR* utilizando DNA extraído de cepas de *L. mesenteroides* (controle positivo) e outras espécies bacterianas (controles negativos). Os valores de C_T e T_M em negrito indicam os valores para o DNA alvo.

Bactéria	C_T	T_{M1}	T_{M2}	Bactéria	C_T	T_{M1}	T_{M2}
	8,97	82,25			18,87	72,25	73,15
<i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	9,20	82,25		<i>W. viridescens</i> W ₈	20,12	68,75	70,60
	9,80	82,25			-	-	
	9,45	82,25			19,33	73,50	74,75
<i>L. mesenteroides</i> CECT 219	9,42	82,25		<i>W. viridescens</i> W ₃₅	19,21	67,25	69,50
	9,15	82,25			-	-	
	11,10	82,65			14,77	85,25	
<i>L. mesenteroides</i> 66	10,84	82,65		<i>L. plantarum</i>	16,99	85,40	
	10,45	82,65			16,20	85,50	
	15,35	82,15			18,87	84,50	
<i>L. mesenteroides</i> L ₁	15,74	82,10		<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	19,00	84,75	
	13,73	82,10			18,58	84,75	
	9,59	82,35			20,50	84,75	
<i>L. mesenteroides</i> L ₈	9,76	82,40		<i>L. casei</i>	21,05	84,85	
	9,70	82,25			18,68	84,40	
	9,83	82,25			16,75	66,75	85,50
<i>L. mesenteroides</i> L ₃₅	10,69	82,25		<i>L. paracasei</i>	17,04	66,50	71,85
	13,39	82,25			17,39	85,60	
	17,85	84,90			19,97	85,25	87,50
<i>W. viridescens</i> ATCC 12706	17,61	85,75		<i>L. bulgaricus</i>	18,36	85,25	
	17,36	85,75			20,58	66,15	85,25
	19,23	74,25	76,85		16,94	88,00	
<i>W. viridescens</i> CECT 283	19,65	67,75	69,85	<i>P. fluorescens</i>	18,53	88,50	
	-	-			ND	ND	
	21,22	73,25	75,75		ND	ND	
<i>W. viridescens</i> 132	20,76	68,25	70,50	Água Milli-Q	ND	ND	
	-	-			ND	ND	
	19,34	75,90	77,60				
<i>W. viridescens</i> W ₁	19,56	70,75	73,00				
	-	-					

ND = não detectado.

- = não realizado.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O par de iniciadores *SCAR* evidenciou amplificação específica para as cepas de *L. mesenteroides* com valor de C_T igual a $10,90 \pm 1,07$ sob as condições ideais de reação e o fragmento amplificado apresentou um valor de T_M de $82,31 \pm 0,09$ °C (Tabela 6.3). Não foi verificada amplificação (sem C_T) quando a água Milli-Q foi utilizada como controle negativo. Entre as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella*, todas as espécies revelaram um

breve sinal de amplificação inespecífica ($C_T < 21$), com os valores de T_M inferiores e superiores aos obtidos para as cepas de *L. mesenteroides*. A espécie *P. fluorescens* também demonstrou um breve sinal de amplificação inespecífica, com medidas de T_M superiores ($T_M > 88$ °C) às obtidas para as cepas de *L. mesenteroides*.

Em dois experimentos independentes, realizou-se o crescimento da cultura mista de *W. viridescens* e da espécie de *L. mesenteroides* a 8 °C, com uma concentração inicial do experimento de $3,18 (\pm 0,10) \log_{10}$ determinada por CP. Após as reações individuais de SYBR® Green qPCR, a média dos valores de C_T determinados foram extrapolados para a curva-padrão correspondente (Figura 6.2), previamente calculada experimentalmente para o coquetel de *W. viridescens*, e os valores resultantes de \log_{10} UFC/mL foram comparados com aqueles obtidos para a contagem total das BAL (CTB) em cultura mista por CP.

As concentrações do coquetel de *W. viridescens* e da espécie de *L. mesenteroides* diferenciadas por SYBR® Green qPCR na cultura mista e seus respectivos valores de T_M das reações estão apresentados na Tabela 6.4. Como pode ser observado, os valores médios de T_M foram de 79,44 e 82,26 °C para *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, respectivamente. Conforme apresentado anteriormente, o coquetel de *W. viridescens* apresentou um valor médio de T_M de $79,37 \pm 0,09$ °C para a construção da curva-padrão na temperatura de 8 °C. Severo (2018) encontrou um valor médio de T_M para *L. mesenteroides* de $82,40 \pm 0,02$ °C. Esses valores comprovam a especificidade do método de SYBR® Green qPCR para identificar e quantificar essas espécies de BAL deteriorantes em cultivo misto. Ilha et al. (2016) utilizaram as reações de SYBR® Green qPCR para quantificação de *L. paracasei* em iogurte (cultura mista de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* e *L. paracasei*) e comprovaram a especificidade das reações por meio dos valores de T_M .

Tabela 6.4 - Valores das concentrações (\log_{10} UFC/mL) do coquetel de *W. viridescens* e da espécie *L. mesenteroides* em cultura mista a 8 °C ($\pm 0,2$ °C) diferenciadas por SYBR® Green qPCR e suas respectivas temperaturas de *melting*.

Tempo (horas)	CTB (\log_{10} UFC/mL) ^a	SYBR® Green qPCR (\log_{10} UFC/mL de <i>W. viridescens</i>) ^b	T _M (°C) ^c	SYBR® Green qPCR (\log_{10} UFC/mL de <i>L. mesenteroides</i>) ^b	T _M (°C) ^c
0	3,18 ± 0,10	3,28 ± 0,07	79,13 ± 0,09	3,31 ± 0,09	82,33 ± 0,05
24	3,63 ± 0,00	4,02 ± 0,16	79,43 ± 0,12	3,84 ± 0,14	82,38 ± 0,02
55	4,88 ± 0,00	5,28 ± 0,09	79,30 ± 0,21	5,85 ± 0,03	82,30 ± 0,04
79	5,23 ± 0,08	5,83 ± 0,04	79,13 ± 0,09	6,16 ± 0,07	82,37 ± 0,01
103	6,40 ± 0,00	5,80 ± 0,01	79,60 ± 0,00	7,32 ± 0,04	82,38 ± 0,02
128	7,19 ± 0,00	6,39 ± 0,15	79,50 ± 0,07	7,77 ± 0,02	82,30 ± 0,04
152	7,89 ± 0,04	7,94 ± 0,05	79,68 ± 0,05	8,85 ± 0,02	82,25 ± 0,00
175	8,73 ± 0,00	8,89 ± 0,03	79,50 ± 0,07	8,75 ± 0,02	82,23 ± 0,08
199	8,91 ± 0,00	8,94 ± 0,01	79,45 ± 0,04	9,09 ± 0,04	82,13 ± 0,09
223	9,21 ± 0,14	8,86 ± 0,05	79,38 ± 0,27	8,88 ± 0,02	82,18 ± 0,12
263	9,31 ± 0,00	9,13 ± 0,01	79,50 ± 0,00	9,11 ± 0,07	82,18 ± 0,12
288	9,24 ± 0,00	9,06 ± 0,03	79,68 ± 0,05	9,21 ± 0,07	82,17 ± 0,07

^aMédia e desvio-padrão das contagens totais das BAL em placa, sem diferenciação das BAL.

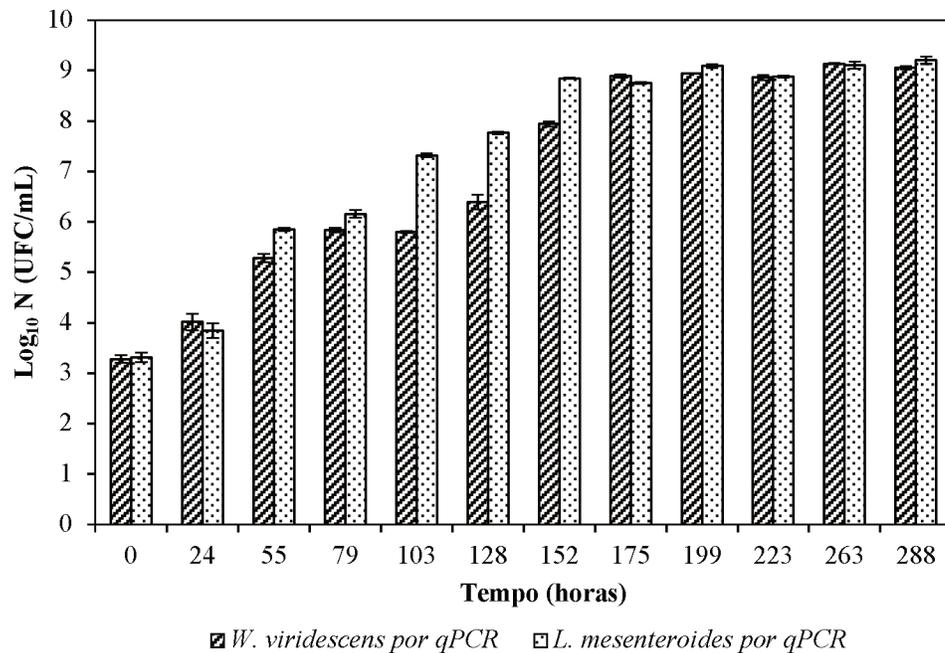
^bMédia e desvio-padrão dos valores de \log_{10} UFC/mL determinados utilizando as curvas-padrão de SYBR® Green qPCR.

^cMédia e desvio-padrão dos valores das T_M obtidas nas reações de SYBR® Green qPCR.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

As contagens de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* obtidos por SYBR® Green qPCR em cultura mista estão apresentados na Figura 6.7.

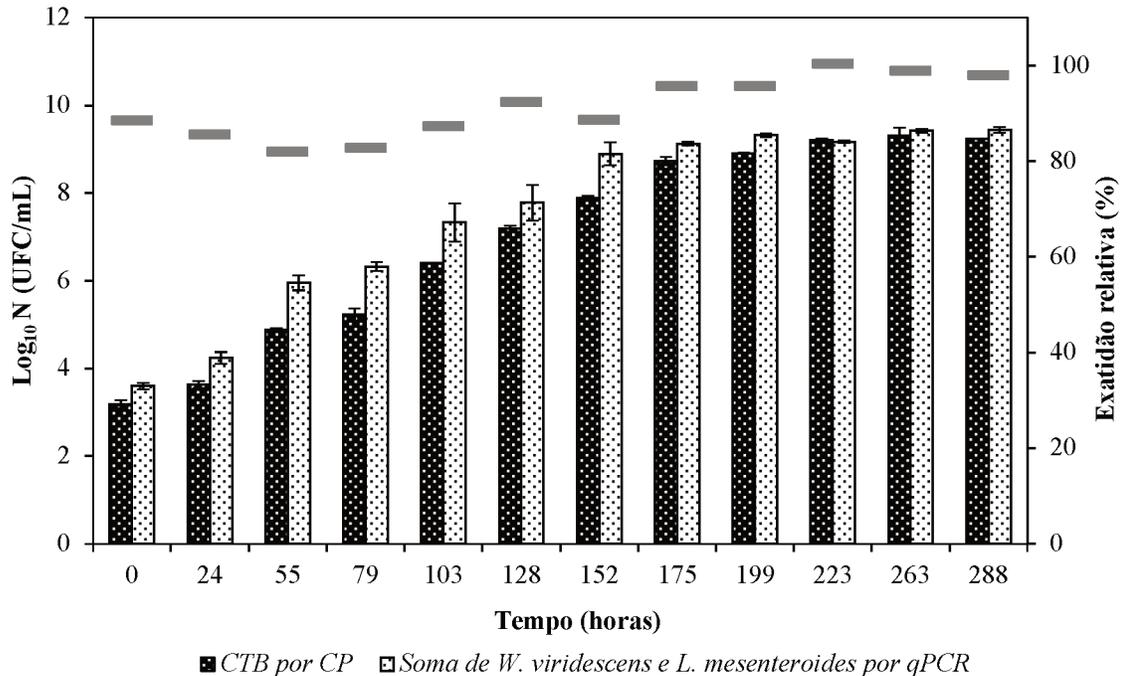
Figura 6.7 – Quantificação de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* na cultura mista por SYBR® Green qPCR a 8 °C.



Elaborada pelo autor (2019).

Ao confrontar o crescimento das duas espécies em cultura mista (Figura 6.7), ambas as espécies apresentaram um crescimento semelhante até 24 h de cultivo. A partir de 55 h de incubação a 8 °C, o coquetel de *W. viridescens* tem seu crescimento diminuído, enquanto a cepa de *L. mesenteroides* atinge um crescimento superior (uma diferença de 0,6 log₁₀ UFC/mL). No entanto, pode-se notar que, na mesma condição de cultivo, o coquetel de *W. viridescens* continuou seu crescimento um pouco mais lento independentemente do comportamento da espécie *L. mesenteroides*. Além disso, em 175 h de cultivo, as duas BAL apresentaram contagens semelhantes e atingiram a fase estacionária de crescimento. Esses resultados corroboram com os relatados por Vermeiren et al. (2005), nos quais a espécie de *W. viridescens* apresentou um crescimento mais lento do que *L. mesenteroides* em presunto cozido a 7 °C, considerando o crescimento em cultura pura, determinado por CP.

Figura 6.8 – Quantificação da contagem total de BAL (CTB) por CP e a soma das quantificações de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* na cultura mista por SYBR® Green qPCR a 8 °C. A exatidão relativa (—) foi expressa como uma porcentagem das CTB em log₁₀ por CP *versus* a soma das quantificações de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* na cultura mista por SYBR® Green qPCR.



Elaborada pelo autor (2019).

Como pode ser observado na Figura 6.8, a quantificação da CTB por CP foi menor, na maioria dos dados, que a soma das quantificações de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* na cultura mista por SYBR® Green qPCR, o que pode estar relacionado as células viáveis, mas não cultiváveis que não são quantificadas pelo método de CP.

6.3 CONCLUSÕES

As curvas-padrão obtidas para o coquetel de cinco cepas de *W. viridescens* apresentaram valores adequados de coeficiente de determinação e de eficiência, além de serem consideradas específicas por meio da análise das curvas de *melting* para as temperaturas de 4, 8, 14 e 30 °C de incubação.

Os valores de LoD foram adequados para a quantificação de *W. viridescens* em todas as temperaturas estudadas. Enquanto os valores de LoQ não foram adequados para quantificação em alguns pontos iniciais do cultivo a 14 °C e 30 °C.

A partir das curvas-padrão foi possível quantificar a cinética do crescimento de *W. viridescens* em cultura pura a 4, 8, 14 e 30 °C pelo método de SYBR[®] Green qPCR. Esse método demonstrou boa correlação e concordância com o método de CP, com um intervalo de confiança de 95%.

A especificidade dos iniciadores de *L. mesenteroides* foi confirmada e, com isso, o método de SYBR[®] Green qPCR foi específico para quantificar essa espécie em cultura mista com *W. viridescens* a 8 °C a partir das curvas-padrão construídas nesse estudo e da curva-padrão de *L. mesenteroides* utilizada da literatura.

7. ESTABELECIMENTO DE MODELOS PREDITIVOS MOLECULARES PARA DESCREVER O CRESCIMENTO DE *Weissella viridescens* E DE *Leuconostoc mesenteroides* EM CULTURAS PURAS E MISTA

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados experimentais de crescimento da cultura pura de *W. viridescens* a 4, 8, 14 e 30 °C e da cultura mista com *L. mesenteroides* a 8 °C, obtidas na Seção 6 foram utilizados para estabelecer os modelos preditivos nessa Seção. Assim, as curvas de crescimento obtidas pelo método de SYBR® Green qPCR foram utilizadas para estabelecer o modelo preditivo molecular (MPM) e as curvas de crescimento obtidas pelo método de CP foram utilizadas para estabelecer o modelo preditivo convencional (MPC). Ambos os modelos foram comparados quanto à qualidade dos ajustes.

7.2.1 Modelagem preditiva

7.2.1.1 Modelagem primária

Os modelos matemáticos primários selecionados estão representados pelas Equações 7.1 a 7.5, sendo dois modelos puramente sigmoidais, Logístico modificado por Zwietering e colaboradores (LMZ) (Equação 7.1) e Gompertz modificado (GOM) (ZWIETERING et al., 1990) (Equação 7.2), e um modelo sigmoide com função de ajuste, Baranyi e Roberts (BAR) (BARANYI; ROBERTS, 1994) (Equações 7.3, 7.4 e 7.5). Os modelos foram ajustados aos dados experimentais de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* obtidas em cultura pura e mista pelos métodos de SYBR® Green qPCR e de CP e a qualidade dos ajustes foi comparada.

Para todos os modelos, $y(t)$ é o logaritmo da concentração microbiana N (UFC/mL) no tempo t (horas), ou seja, $y(t) = \log [N(t)]$, e $Y(t)$ é o logaritmo da razão entre a concentração microbiana N no tempo t e a concentração microbiana inicial N_0 , ou seja, $Y(t) = \log [N(t)/N_0]$. O parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1}); λ é a duração da fase de

latência (h); y_0 é o logaritmo da concentração microbiana inicial, $y_0 = \log(N_0)$; $y_{máx}$ é o logaritmo da população máxima, $y_{máx} = \log(N_{máx})$; A é a amplitude da concentração do crescimento microbiano, $A = \log(N_{máx}/N_0)$; h_0 é o parâmetro relacionado ao estado fisiológico das células (adimensional); $F(t)$ é a função do modelo BAR e λ é o número de Euler.

$$\text{LMZ} \quad Y(t) = \frac{A}{1 + e \left[\frac{4\mu_{máx}}{A} (\lambda - t) + 2 \right]} \quad (7.1)$$

$$\text{GOM} \quad Y(t) = A e \left\{ -e \left[\frac{e\mu_{máx}}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (7.2)$$

$$y(t) = y_0 + \mu_{máx} F(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{e^{\mu_{máx} F(t)} - 1}{e^{y_{máx} - y_0}} \right\} \quad (7.3)$$

$$\text{BAR} \quad F(t) = t + \left(\frac{1}{\mu_{máx}} \right) \ln \left[e^{(-\mu_{máx} t)} + e^{(-h_0)} - e^{(-\mu_{máx} t - h_0)} \right] \quad (7.4)$$

$$h_0 = \mu_{máx} \lambda \quad (7.5)$$

Conforme proposto por diversos autores (BARANYI; ROBERTS, 1994; BARANYI et al., 1995; BELLARA et al., 2000; BOVILL et al., 2000; BOVILL; BEW; BARANYI, 2001), uma abordagem de modelagem prática quando se utiliza o modelo de BAR é a obtenção de um valor significativo para o parâmetro h_0 e um reajuste aos dados experimentais para estimar somente os três parâmetros restantes (y_0 , $y_{máx}$ e $\mu_{máx}$). Esta proposta, baseada em observações experimentais (BARANYI; ROBERTS, 1994; BARANYI et al., 1995; LONGHI et al., 2013; MENEZES et al., 2018), consideram h_0 como o produto da velocidade de crescimento específica máxima e o tempo de latência, uma relação que não é afetada por pequenas mudanças nas condições ambientais, especialmente da temperatura (ver Equação 7.5). Assim, h_0 é aproximadamente constante em situações em que o histórico de pré-inoculação das células é idêntico.

7.2.1.2 Modelagem secundária

Os modelos secundários Exponencial e Raiz quadrada (RATKOWSKY et al., 1982) (Equações 7.6 e 7.7, respectivamente) foram usados para descrever o efeito da temperatura na velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{máx}$), em que a (h^{-1}), b ($^{\circ}\text{C}^{-1}$) e c ($^{\circ}\text{C}^{-1} \text{h}^{-0,5}$) são

parâmetros empíricos, T é a temperatura de armazenamento (°C) e T_{min} é a temperatura teórica mínima de crescimento (°C).

$$\mu_{max} = ae^{(bT)} \quad (7.6)$$

$$\sqrt{\mu_{max}} = c(T - T_{min}) \quad (7.7)$$

7.2.2 Análise numérica

Os ajustes dos modelos primários aos dados experimentais de crescimento microbiano obtidos pelos métodos de SYBR[®] Green qPCR e de CP, bem como os ajustes dos modelos secundários, foram realizados em *software* Matlab R2013a (MathWorks[®], Natick, EUA). Para os modelos sigmóides LMZ e GOM, as estimativas dos parâmetros foram realizadas com o ajuste dos modelos aos dados experimentais. Para o modelo BAR, a estimação dos parâmetros foi realizada em modelagem em duas etapas (MDE). Na primeira, a estimação dos parâmetros foi realizada por meio do ajuste do modelo aos dados experimentais, onde foi calculado o valor médio aritmético do parâmetro h_0 para todas as temperaturas. Na segunda, esse valor médio h_0 foi fixado e os parâmetros y_0 , $\mu_{máx}$ e $y_{máx}$ foram estimados por um novo ajuste para cada temperatura, conforme abordado por Baranyi et al. (1995), Amézquita et al. (2005), Longhi et al. (2013) e Menezes et al. (2018). O parâmetro λ foi calculado de acordo com a Equação 7.5.

Para explicar a cinética das duas BAL em cultura mista, a partir dos parâmetros de crescimento, uma abordagem descrita por Cauchie et al. (2017) foi utilizada nesse trabalho. Segundo esses autores, a subdivisão da cepa bacteriana é baseada em três classes chamadas dominante (D), subdominante (S) e inibida (I), conforme a Tabela 7.1. Assim, o comportamento de cada BAL na cultura mista foi avaliado por meio das Equações 7.8, 7.9 e 7.10.

Tabela 7.1 - Subdivisão das cepas bacterianas baseada nos parâmetros de crescimento em três classes: D (“dominante”), S (“subdominante”) e I (“inibida”).

Classe	$\mu_{m\acute{a}x}^*$	$y_{m\acute{a}x}^{**}$	TAFE ^{***}
D	O maior valor	Valor máximo	Atinge rapidamente
S	Geralmente menor	Valor alto	Continua a crescer quando os organismos D atingem a fase estacionária
I	Menor ou igual	Valor inferior	O mesmo que os organismos D

*Velocidade específica máxima de crescimento bacteriano (1/h)

**Concentração máxima bacteriana (\log_{10} UFC/mL)

***Tempo para atingir a fase estacionária (horas).

Fonte: Adaptada de Cauchie et al. (2017).

$$SE (y_{\max \text{ bact\acute{e}ria}} > y_{\max \text{ outras}}) \& (\mu_{\max \text{ bact\acute{e}ria}} > \mu_{\max \text{ outras}}) \& (TAFE_{\text{bact\acute{e}ria}} < TAFE_{\text{outras}}) = \text{Esp\acute{e}cie dominante} \quad (7.8)$$

$$SE (y_{\max \text{ bact\acute{e}ria}} \approx y_{\max \text{ outras}}) \& (\mu_{\max \text{ bact\acute{e}ria}} \leq \mu_{\max \text{ outras}}) \& (TAFE_{\text{bact\acute{e}ria}} > TAFE_{\text{outras}}) = \text{Esp\acute{e}cie subdominante} \quad (7.9)$$

$$SE (y_{\max \text{ bact\acute{e}ria}} < y_{\max \text{ outras}}) \& (\mu_{\max \text{ bact\acute{e}ria}} \leq \mu_{\max \text{ outras}}) \& (TAFE_{\text{bact\acute{e}ria}} = TAFE_{\text{outras}}) = \text{Esp\acute{e}cie inibida} \quad (7.10)$$

7.2.3 Avaliação do desempenho dos modelos

Não existe um método estatístico simples e único para avaliar semelhanças e diferenças entre modelos não-lineares, e para lidar com a questão de qual modelo deve ser usado. Geralmente, vários procedimentos são usados para se obter uma visão geral do comportamento do modelo e escolher aquele que é mais consistente para a maioria dos índices estatísticos realizados (LOPEZ et al., 2004). Assim, para avaliar o desempenho dos modelos, o Coeficiente de Determinação Ajustado (R^2_{aj}) (SOPER et al., 1917), a Raiz do Erro Quadrado Médio (RMSE, \log UFC/g), o Fator de tendência (F_T) e o Fator de Exatidão (F_E) foram calculados pelas Equações de 7.11 a 7.14, respectivamente, em que n é o número de observações, p é o número de parâmetros do modelo, y_{obs} , y_{pred} e \bar{y} são os valores observados, preditos e médios, respectivamente. Segundo Ross (1996), o valor de F_T é uma medida da variação média entre os valores observados e preditos, e o valor de F_E mede a diferença média entre os valores observados e preditos. Um valor de $R^2_{aj} = 1$, $F_T = 1$, $F_E = 1$ e $RMSE = 0$ indica que existe uma concordância perfeita entre todos os valores observados e preditos.

$$R^2_{aj} = 1 - \left[\frac{n-1}{n-(p+1)} \right] \left\{ 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{obs})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs} - \bar{y})^2} \right] \right\} \quad (7.11)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_{pred} - y_{obs})^2}{n - p}} \quad (7.12)$$

$$F_T = 10^{\left| \frac{\sum \log(y_{pred}/y_{obs})}{n} \right|} \quad (7.13)$$

$$F_E = 10^{\left| \frac{\sum |\log(y_{pred}/y_{obs})|}{n} \right|} \quad (7.14)$$

Um valor de F_T menor que 1 indica que um modelo é, em geral, à prova de falhas (PAL; LABUZA; DIEZ-GONZALEZ, 2008). No entanto, o F_T não fornece nenhuma indicação de exatidão média das estimativas, pois as previsões de subestimação e superestimação tendem a se anular (YANG et al., 2009).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Modelagem primária de *W. viridescens* por CP e SYBR® Green qPCR

Nesse estudo, os dados de crescimento de um coquetel de cinco linhagens de *W. viridescens* em meio de cultivo a 4, 8, 14 e 30 °C foram obtidas pelos métodos de CP e de SYBR® Green qPCR, representados na Figura 7.1.

Na Figura 7.1a são apresentados os dados de crescimento ($Y(\log N/N_0)$) e os ajustes dos modelos primários de GOM e de LMZ, enquanto na Figura 7.1b são apresentados os dados de crescimento ($y(\log N)$) e os ajustes do modelo primário de BAR. Ambos os modelos ajustaram-se bem aos dados de crescimento convencionais e moleculares.

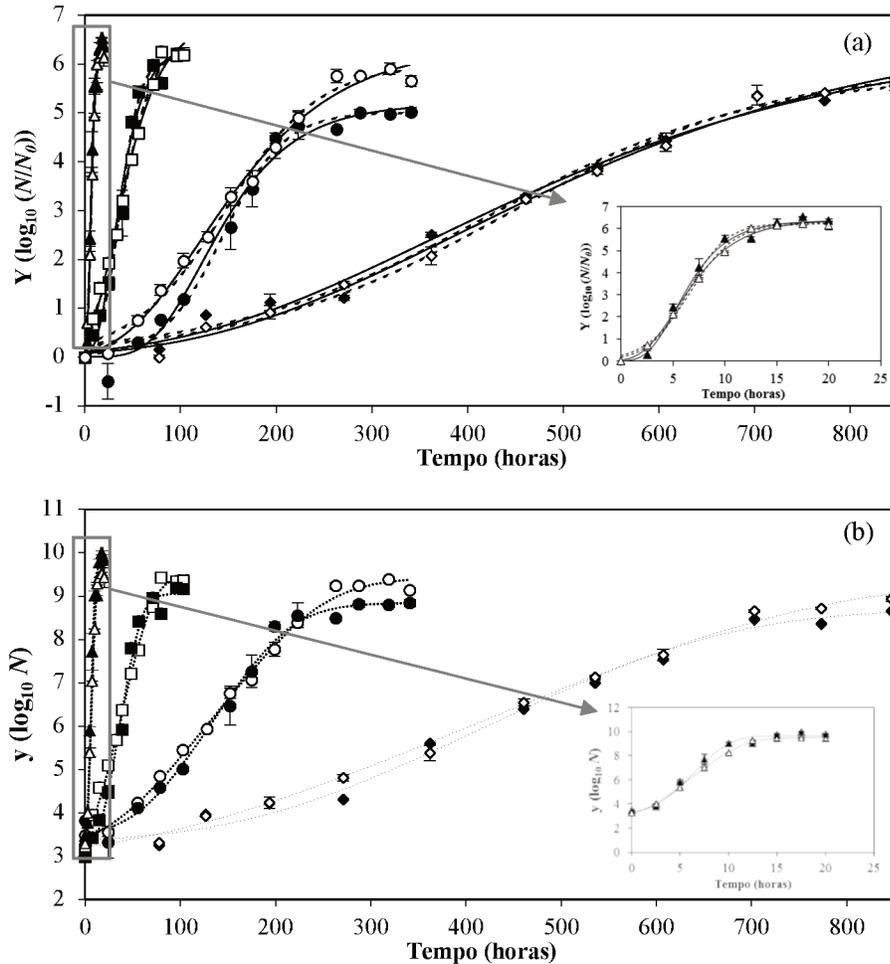
Na primeira etapa, foi calculado o valor médio (\pm DP) para o parâmetro h_0 , resultando em $h_0 = 1,12 (\pm 0,17)$ (método de CP) e $h_0 = 2,33 (\pm 0,35)$ (método de SYBR® Green qPCR). Na segunda etapa, o modelo de BAR (com valor fixo do parâmetro h_0) foi ajustado novamente aos dados experimentais do crescimento *W. viridescens* em meio de cultivo, e três parâmetros do modelo (y_0 , $\mu_{máx}$ e $y_{máx}$) foram estimados, tal como proposto por Baranyi et al. (1995). Como o valor do parâmetro y_0 não apresenta uma grande variação em todas curvas ($3,31 \pm 0,06 \log_{10}$ por

CP e $3,34 \pm 0,19 \log_{10}$ por SYBR[®] Green qPCR), apenas os parâmetros λ , $\mu_{máx}$ e A ou $y_{máx}$ são apresentados na Tabela 7.2.

Especificamente, quando o coquetel de *W. viridescens* é a 4, 8, 14 e 30 °C, os modelos de BAR, de GOM e de LMZ foram aplicáveis para descrever o crescimento de um coquetel de *W. viridescens* para ambos os métodos. Todos os dados de crescimento têm tendências crescentes demonstrando curvas de crescimento sigmoide (exibem as fases de latência, exponencial e estacionária). O coquetel de cepas usado para desenvolver modelos preditivos pode aumentar a confiança na capacidade do modelo de prever, com precisão, toda a faixa de cenários ambientais (DE BLACKBURN, 2006).

As contagens iniciais variaram entre 3,16 a 3,48 \log_{10} UFC/mL e entre 2,98 e 3,82 \log_{10} UFC/mL obtidas pelos métodos CP e SYBR[®] Green qPCR, respectivamente, considerando todos os dados de crescimento enumerados para todas as temperaturas avaliadas. A fase estacionária foi alcançada após aproximadamente 1, 4, 14 e 35 dias a 30, 14, 8 e 4 °C, respectivamente. Como presumido, a temperatura teve um forte impacto no comportamento bacteriano.

Figura 7.1 - Curvas de crescimento de *W. viridescens* em diferentes temperaturas e os ajustes dos modelos de (a) GOM (—) e de LMZ (---) e (b) de BAR (· ·). Em ambas as figuras, os dados experimentais foram obtidos pelos métodos de SYBR® Green qPCR (símbolos preenchidos) e CP (símbolos vazados) nas temperaturas de 4 °C (◆ ou ◇), 8 °C (● ou ○), 14 °C (■ ou □) e 30 °C (▲ ou △). As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A temperatura é um fator importante e reprodutível que determina o crescimento de *W. viridescens*, com a velocidade aumentando com o aumento da temperatura de armazenamento, dentro da faixa estudada. As fases de latência foram evidentes em todos os modelos, e os cultivos armazenados em baixas temperaturas tiveram fases mais longas do que aqueles em altas temperaturas. A velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{m\acute{a}x}$ (1/h) variou entre 0,010 1/h e 0,734 1/h para os dados obtidos por CP e entre 0,009 1/h e 0,866 1/h para os dados obtidos por SYBR® Green qPCR, e o tempo de latência λ diminuiu de 169,8 h a 4 °C para 1,69 h a 30 °C para

os dados obtidos por CP e de 198 h a 4 °C para 2,57 h a 30 °C para os dados obtidos por SYBR® Green qPCR (Tabela 7.2). Camargo et al. (2018) estudaram o crescimento de BAL em diferentes temperaturas pelo método de CP e a cultura pura de *W. viridescens* ATCC™ 12706 apresentou valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ entre 0,02 1/h a 0,78 1/h para as temperaturas de 4 °C a 30 °C, respectivamente. Esses resultados são similares aos relatados nesse estudo para o coquetel de *W. viridescens* quando enumerada pelo método de CP.

No geral, os resultados apresentados na Tabela 7.2 demonstram que, para os dados obtidos pelo método de CP nas quatro temperaturas avaliadas, os parâmetros $\mu_{m\acute{a}x}$ e λ são maiores quando estimados pelo modelo LMZ e menores pelo modelo de BAR, enquanto para os dados obtidos por SYBR® Green qPCR, o modelo de GOM fornece estimativas menores para esses parâmetros. A contagem bacteriana máxima em todos os casos foi superior a 8,70 log₁₀ UFC/mL (parâmetro $y_{m\acute{a}x}$ do modelo de BAR) e superior a 5,01 log₁₀ UFC/mL (parâmetro A (log₁₀ N/N_0) dos modelos de GOM e de LMZ), independente das condições de armazenamento. Os modelos LMZ e GOM são empíricos e, às vezes, podem superestimar as velocidades máximas específicas de crescimento. No entanto, eles foram amplamente utilizados na literatura (DIEZ-GONZALEZ et al., 2007; GIFFEL; ZWIETERING, 1999; HUANG et al., 2010; JUNEJA; MARKS; THIPPAREDDI, 2008; MURPHY; REA; HARRINGTON, 1996). Enquanto isso, para comparar diretamente esses modelos nesse estudo, um modelo de crescimento com significado biológico (BARANYI; ROBERTS, 1994) usado na literatura foi utilizado. Um bom ajuste do modelo de BAR já foi verificado, anteriormente, por Camargo et al. (2018) e Martins et al. (2016).

Tabela 7.2 - Parâmetros de crescimento ($\pm 95\%$ IC) estimados pelos modelos de BAR (h_0 fixo = 1,12 para os ajustes dos dados obtidos por CP e h_0 fixo = 2,33 para os ajustes dos dados obtidos por SYBR[®] Green qPCR), de GOM e de LMZ aos dados experimentais do coquetel de *W. viridescens* em meio de cultivo armazenados a 4, 8, 14 e 30 °C obtidos pelos métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR.

Método	T (°C) ($\pm 0,2$ °C)	μ_{\max} (1/h)	λ (h)	A ou y_{\max} (\log_{10} UFC/mL) ^a
		Modelo de Baranyi e Roberts (BAR)		
CP	4	0,010 ($\pm 0,001$)	116,2 ($\pm 8,479$)	9,383 ($\pm 0,502$)
	8	0,029 ($\pm 0,002$)	38,42 ($\pm 2,335$)	9,441 ($\pm 0,223$)
	14	0,101 ($\pm 0,009$)	11,05 ($\pm 1,024$)	9,466 ($\pm 0,301$)
	30	0,660 ($\pm 0,032$)	1,696 ($\pm 0,087$)	9,518 ($\pm 0,131$)
qPCR	4	0,012 ($\pm 0,001$)	198,2 ($\pm 19,04$)	8,702 ($\pm 0,437$)
	8	0,037 ($\pm 0,003$)	63,312 ($\pm 5,52$)	8,846 ($\pm 0,259$)
	14	0,144 ($\pm 0,014$)	16,219 ($\pm 1,78$)	9,055 ($\pm 0,329$)
	30	0,866 ($\pm 0,148$)	2,688 ($\pm 0,555$)	9,682 ($\pm 0,469$)
Modelo de Gompertz Modificado (GOM)				
CP	4	0,010 ($\pm 0,001$)	129,2 ($\pm 33,81$)	6,823 ($\pm 0,920$)
	8	0,029 ($\pm 0,004$)	38,80 ($\pm 13,45$)	6,392 ($\pm 0,502$)
	14	0,094 ($\pm 0,015$)	3,953 ($\pm 5,027$)	6,860 ($\pm 0,638$)
	30	0,720 ($\pm 0,108$)	2,048 ($\pm 0,665$)	6,392 ($\pm 0,281$)
qPCR	4	0,009 ($\pm 0,001$)	106,3 ($\pm 44,70$)	6,589 ($\pm 0,920$)
	8	0,036 ($\pm 0,008$)	68,78 ($\pm 17,36$)	5,184 ($\pm 0,413$)
	14	0,134 ($\pm 0,036$)	12,46 ($\pm 6,410$)	6,349 ($\pm 0,545$)
	30	0,868 ($\pm 0,261$)	2,569 ($\pm 1,099$)	6,371 ($\pm 0,472$)
Modelo Logístico Modificado por Zwietering (LMZ)				
CP	4	0,011 ($\pm 0,002$)	169,8 ($\pm 41,00$)	5,938 ($\pm 0,529$)
	8	0,031 ($\pm 0,005$)	49,28 ($\pm 15,37$)	5,982 ($\pm 0,363$)
	14	0,100 ($\pm 0,017$)	7,394 ($\pm 5,223$)	6,414 ($\pm 0,413$)
	30	0,734 ($\pm 0,119$)	2,417 ($\pm 0,760$)	6,226 ($\pm 0,243$)
qPCR	4	0,010 ($\pm 0,002$)	146,0 ($\pm 47,50$)	5,793 ($\pm 0,557$)
	8	0,039 ($\pm 0,009$)	81,41 ($\pm 17,54$)	5,012 ($\pm 0,292$)
	14	0,146 ($\pm 0,031$)	16,110 ($\pm 5,20$)	6,137 ($\pm 0,339$)
	30	0,854 ($\pm 0,332$)	2,780 ($\pm 1,619$)	6,260 ($\pm 0,535$)

^aParâmetro A para os modelos GOM e LMZ e y_{\max} para o modelo BAR.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

7.3.2 Desempenho dos modelos primários convencionais e moleculares

Todas as curvas de crescimento contendo modelos preditivos moleculares e convencionais foram avaliadas pelos valores do Coeficiente de Determinação Ajustado (R^2_{aj}), a Raiz do Erro de Quadrático Médio (RMSE), o Fator de tendência (F_T) e o Fator de exatidão (F_E). Os índices estatísticos do desempenho dos três modelos ajustados em cada temperatura avaliada são

apresentados na Tabela 7.3. Os modelos primários avaliados (BAR, GOM e LMZ) apresentaram bons ajustes às curvas de crescimento de *W. viridescens*.

Tabela 7.3 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste dos modelos BAR, GOM e LMZ aos dados experimentais do coquetel de *W. viridescens* em meio de cultivo armazenados a 4, 8, 14 e 30 °C obtidos pelos métodos de CP e de SYBR® Green qPCR.

Método	T (°C) (± 0,2 °C)	R^2_{aj}	RMSE	F_T	F_E
		Modelo de Baranyi e Roberts (BAR)			
CP	4	0,995	0,157	1,000	1,021
	8	0,995	0,149	1,000	1,017
	14	0,992	0,197	1,001	1,026
	30	0,999	0,093	1,000	1,011
qPCR	4	0,988	0,232	1,002	1,040
	8	0,990	0,220	1,000	1,030
	14	0,989	0,271	1,000	1,033
	30	0,979	0,377	1,002	1,039
Modelo de Gompertz Modificado (GOM)					
CP	4	0,994	0,171	0,956	1,076
	8	0,992	0,200	1,080	1,146
	14	0,989	0,233	0,967	1,068
	30	0,996	0,152	0,982	1,039
qPCR	4	0,989	0,221	1,022	1,157
	8	0,986	0,262	0,936	1,112
	14	0,982	0,338	0,900	1,178
	30	0,986	0,304	1,073	1,129
Modelo Logístico Modificado por Zwietering (LMZ)					
CP	4	0,991	0,200	0,963	1,057
	8	0,989	0,225	1,130	1,201
	14	0,989	0,232	0,975	1,045
	30	0,996	0,165	1,002	1,031
qPCR	4	0,988	0,227	1,051	1,177
	8	0,987	0,245	0,968	1,056
	14	0,989	0,260	0,956	1,085
	30	0,977	0,399	1,098	1,174

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Na tabela 7.3, para os dados obtidos por CP, os valores de R^2_{aj} variaram de 0,989 a 0,999 e valores de RMSE variaram de 0,093 a 0,225 \log_{10} UFC/mL; enquanto nos dados obtidos por SYBR® Green qPCR, os valores de R^2_{aj} variaram de 0,977 a 0,990 e RMSE variaram de 0,220 a 0,399 \log_{10} UFC/mL, para ambos os modelos. Baseado nisso, o modelo LMZ resultou em valores RMSE relativamente maiores em relação aos outros modelos nas temperaturas de 4 e 30 °C. A

menor qualidade do ajuste do modelo LMZ já foi relatada por Longhi et al. (2013) ao estimar o crescimento de *L. plantarum* em meio de cultivo e diferentes condições isotérmicas. Segundo os autores, esse fato pode ser explicado pela simetria em torno do ponto de inflexão. Além disso, os valores dos índices estatísticos do modelo de BAR foram melhores que os valores do modelo de GOM, como também foi observado por Gonçalves et al. (2017), Camargo et al. (2018) e Menezes et al. (2018).

Geralmente, o modelo é considerado com alto desempenho e precisão se os valores de F_T e F_E estiverem entre $1,0 \leq F_T \leq F_E \leq 1,1$ definido como limite satisfatório por vários autores (YANG et al., 2009; YE et al., 2013; LIAO et al., 2015). No geral, como apresentado na Tabela 7.3, pode-se observar que todos os valores de F_T e F_E do modelo de BAR estavam dentro desse limite, enquanto para os modelos GOM e LMZ apenas alguns valores foram satisfatórios para os dados obtidos por CP e por SYBR[®] Green qPCR para todas as temperaturas. Os índices F_T e F_E fornecem uma indicação objetiva do desempenho do modelo. Neste estudo, os resultados dos valores médios de F_E para todos os modelos foram de 1,062 a 1,101 obtidos por CP e SYBR[®] Green qPCR, respectivamente. Ross, Dalgaard e Tienungoon (2000) sugeriram que um F_E aceitável poderia basear-se no número de parâmetros ambientais em um modelo cinético. Ye et al. (2013) mostraram que os valores médios de F_E calculados a partir dos modelos de BAR, de GOM, Logístico modificado e Huang para *L. monocytogenes* em carne de porco refrigerada embalada a vácuo foram de 1,0385 e 1,0390 obtidos por CP e SYBR[®] Green qPCR, respectivamente. Severo et al. (2018) sugeriram que os valores médios de F_E , calculados a partir do modelo de BAR, de 1,2919 e 1,6871 obtidos por CP e SYBR[®] Green qPCR, respectivamente, foram adequados para descrever as curvas de crescimento de *L. mesenteroides* em meio de cultivo armazenados em diferentes condições isotérmicas. No entanto, nesse estudo, os valores médios de F_E foram bons para avaliação do desempenho dos modelos preditivos convencionais e moleculares em comparação com as referências mencionadas.

7.3.3 Modelagem secundária de *W. viridescens* usando os métodos de CP e de SYBR[®] Green qPCR

Nesse estudo, os valores do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidos dos modelos primários de BAR, de GOM e LMZ foram usados para estimar os parâmetros dos modelos secundários Exponencial e Raiz quadrada de Ratkowsky para avaliar o efeito da temperatura (4, 8, 14 e 30 °C) de armazenamento no crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo. As equações para os dois modelos secundários contendo os parâmetros estimados dos modelos preditivos moleculares e convencionais e os valores dos índices estatísticos (R^2_{aj} e de RMSE) são apresentados na Tabela 7.4, e o ajuste dos modelos secundários para $\mu_{m\acute{a}x}$ são representados na Figura 7.2. Os resultados indicaram que o coquetel de *W. viridescens* armazenado a temperaturas constantes de 4 a 30 °C cresceram conforme o esperado, ou seja, o aumento da velocidade de crescimento com o aumento da temperatura, como já mencionado anteriormente.

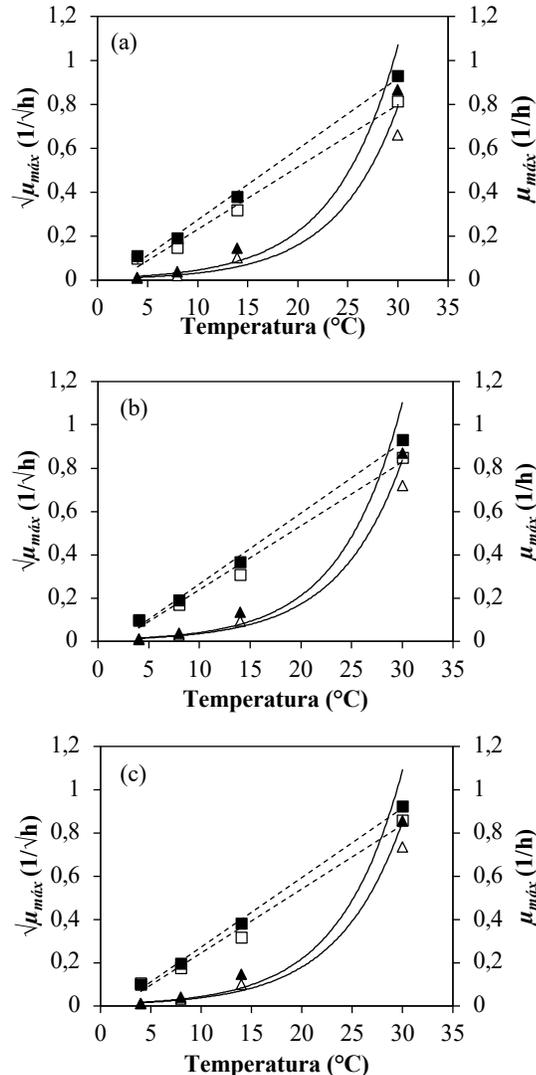
O modelo secundário de raiz quadrada de Ratkowsky melhor representou a influência da temperatura no parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ dos modelos moleculares, com valores de $R^2_{aj} \geq 0,993$ e valores de $RMSE \leq 0,022$. O ajuste do modelo Exponencial representou bem a influência da temperatura no parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ para todos os modelos moleculares e convencionais, com valores de $R^2_{aj} \geq 0,995$ e $RMSE \leq 0,013$, conforme representado na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 – Equações dos modelos secundários Exponencial e Raiz quadrada de Ratkowsky para os valores do parâmetro $\mu_{máx}$ estimados pelos modelos primários BAR, GOM e LMZ e os índices estatísticos (R^2_{aj} e RMSE).

Modelo primário	Método	Equações dos modelos secundários					
		Exponencial	R^2_{aj}	RMSE	Raiz quadrada de Ratkowsky	R^2_{aj}	RMSE
BAR	CP	$\mu_{máx} = 0,014e^{(0,129T)}$	0,996	0,019	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,024$ (T-1,87)	0,986	0,038
	SYBR® Green qPCR	$\mu_{máx} = 0,021e^{(0,124T)}$	0,995	0,027	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,032$ (T-1,50)	0,993	0,030
GOM	CP	$\mu_{máx} = 0,013e^{(0,134T)}$	0,999	0,013	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,029$ (T-1,91)	0,981	0,047
	SYBR® Green qPCR	$\mu_{máx} = 0,019e^{(0,127T)}$	0,996	0,025	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,033$ (T-1,90)	0,994	0,030
LMZ	CP	$\mu_{máx} = 0,014e^{(0,132T)}$	0,998	0,014	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,030$ (T-1,72)	0,982	0,045
	SYBR® Green qPCR	$\mu_{máx} = 0,022e^{(0,122T)}$	0,995	0,029	$\sqrt{\mu_{máx}} = 0,032$ (T-1,53)	0,996	0,022

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 7.2 - Ajustes dos modelos secundários aos dados do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidos pelo modelo primário de (a) BAR, (b) GOM e (c) LMZ. Os dados experimentais foram obtidos pelos métodos SYBR[®] Green qPCR (■ ou ▲) e CP (□ ou △). Em todos os dois gráficos, a linha tracejada representa o ajuste do modelo secundário da raiz quadrada de Ratkowsky e as linhas contínuas representam o ajuste do modelo secundário exponencial.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

7.3.4 Modelos moleculares para descrever o crescimento de *W. viridescens* e *L. mesenteroides* em cultura mista

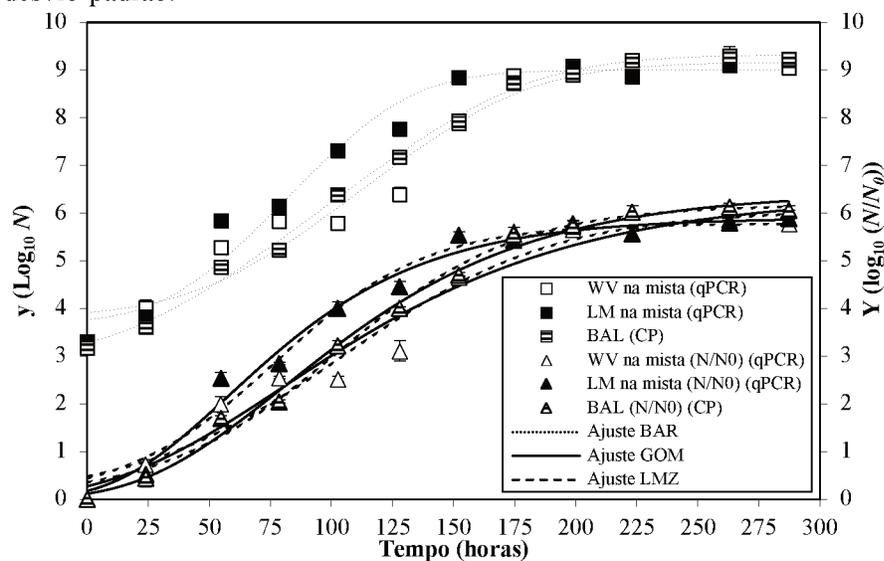
Em dois experimentos independentes, realizou-se o crescimento da cultura mista de *W. viridescens* e *L. mesenteroides* a 8 °C, com uma concentração inicial (contagem total das BAL)

do experimento de $3,18 (\pm 0,10) \log_{10}$ determinada por CP. A curva de crescimento de *W. viridescens* na cultura mista foi determinada por SYBR[®] Green qPCR, conforme abordado na Seção 6. Para a diferenciação da curva de crescimento de *L. mesenteroides* presente na cultura mista, a curva-padrão de qPCR construída para a temperatura de 8 °C (R^2 de 0,99 e Eficiência de 100%) elaborada por Severo (2018) foi utilizada nesse trabalho.

Para a determinação dos parâmetros de crescimento da CTB (h_0 fixo = 1,12) e do crescimento de *W. viridescens* em cultura mista (h_0 fixo = 2,33), estimados pelo modelo de BAR, foram utilizados os valores do parâmetro h_0 conforme mencionados anteriormente no item 7.3.1. Severo (2018) ajustou o modelo de BAR aos dados de crescimento de *L. mesenteroides* obtidos por SYBR[®] Green qPCR em cinco temperaturas isotérmicas e obteve um valor médio de h_0 fixo de 1,41. Assim, esse valor foi utilizado para o ajuste do modelo de BAR aos dados de *L. mesenteroides* em cultura mista realizados nesse trabalho.

As curvas de crescimento da CTB, de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* em cultura mista, bem como os ajustes dos modelos de BAR, de GOM e LMZ são apresentados na Figura 7.3.

Figura 7.3 - Curvas de crescimento da CTB (determinada por CP), *W. viridescens* (WV) e *L. mesenteroides* (LM) em cultura mista, determinadas por SYBR[®] Green qPCR a 8 °C ($\pm 0,2$ °C) de incubação e os ajustes dos modelos de BAR (dados do eixo primário), de GOM e LMZ (dados do eixo secundário). As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Como pode ser observado, ambas as curvas representaram uma cinética com as fases de latência, exponencial e estacionária. Além disso, todos os três modelos foram adequados para descrever as curvas de crescimento em cultivo misto a 8 °C. O uso de uma temperatura de refrigeração para estudos de cultivo misto fornece uma simulação mais próxima do comportamento de uma microbiota deteriorante de produtos cárneos quando armazenados, por exemplo, em supermercados ou em refrigeradores domésticos (JAMES; EVANS; JAMES, 2008; HASSAN; DIMASSI, 2014). Martins (2015) estudou a predição do crescimento de *W. viridescens* em meio de cultivo sob armazenamento em refrigerador doméstico, com oscilações de temperatura entre 6 °C a 12 °C na prateleira superior e entre 5 °C e 9 °C na prateleira inferior do refrigerador. Esse autor demonstrou que o modelo preditivo de BAR superestimou o crescimento de *W. viridescens*, com relação aos dados experimentais. Silva et al. (2017) validaram o modelo de BAR para a predição de *W. viridescens* em presunto sob diferentes condições não-isotérmicas, desde a refrigeração até a temperatura ótima de crescimento. No entanto, um modelo preditivo para estudar o crescimento de um coquetel dessa espécie em interação com outras BAL ainda não foi estabelecido. Com isso, os resultados apresentados nesse trabalho destacam a importância de combinar o método de SYBR[®] Green qPCR com a modelagem preditiva, para oferecer uma nova ferramenta de estudo da evolução das espécies de BAL deteriorantes em condições de refrigeração.

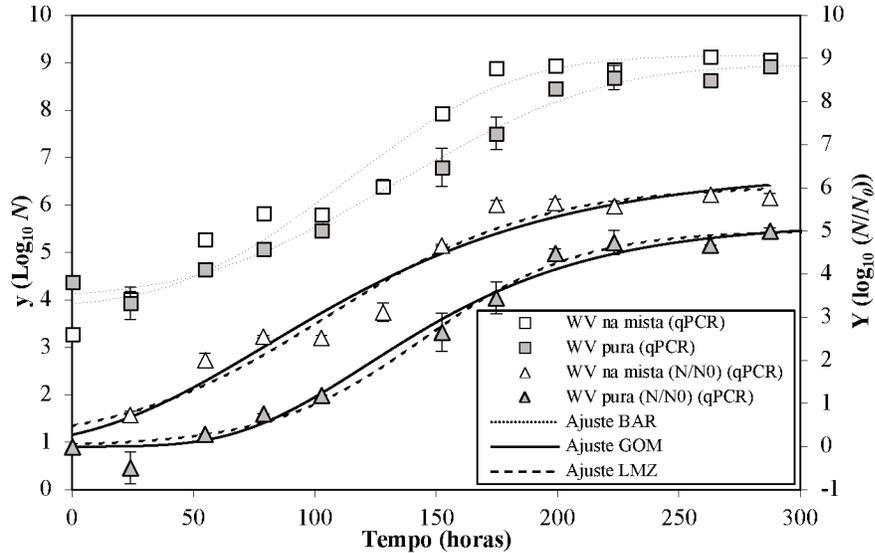
Como pode ser observado na Figura 7.3, o crescimento das duas espécies em cultura mista é semelhante até 25 h de cultivo. A partir de 50 h de incubação a 8 °C, o coquetel de *W. viridescens* tem seu crescimento diminuído, enquanto a cepa de *L. mesenteroides* atinge um crescimento superior (uma diferença de 0,6 log₁₀). No entanto, a velocidade de crescimento diminui no tempo de 75 h, provocando uma tendência de fases de latência intermediárias e, em seguida, *L. mesenteroides* apresenta um crescimento superior até o início da fase estacionária de crescimento (~152 h). Para Huang (2003), Swinnen et al. (2004) e Longhi et al. (2013) a geração de fases de latência intermediárias pode estar relacionada às súbitas variações ambientais. No entanto, nesse estudo, pode estar relacionada às interações entre as espécies em cultivo misto, pois pode ocorrer uma diminuição do crescimento da espécie subdominante frente ao crescimento da espécie dominante. Para exemplificar este fato, pode-se notar que, na mesma condição de cultivo, o coquetel de *W. viridescens* continuou seu crescimento um pouco mais lento independentemente do comportamento da espécie *L. mesenteroides*. Esse fenômeno também foi observado por outros

pesquisadores e eles propuseram que o crescimento da população subdominante é apenas parcialmente afetada pelo recurso limitante e/ou inibição de resíduos que a levou a parar de crescer (GNANOU BESSE et al., 2006; CORNU et al., 2011). Essas interações entre as espécies alteraram o formato sigmoide das curvas de crescimento e, conseqüentemente, podem gerar uma diminuição no desempenho dos modelos em descrever a cinética das BAL em cultura mista.

Os resultados observados na Figura 7.3 corroboram com estudos relatados por Diez et al. (2009a). Os autores observaram que *L. mesenteroides*, quando inoculado em conjunto com *W. viridescens* em *morcilla* de Burgos, se torna dominante, demonstrando que as alterações sensoriais e voláteis nas amostras de *morcilla* analisadas são devidas principalmente à influência de *L. mesenteroides*.

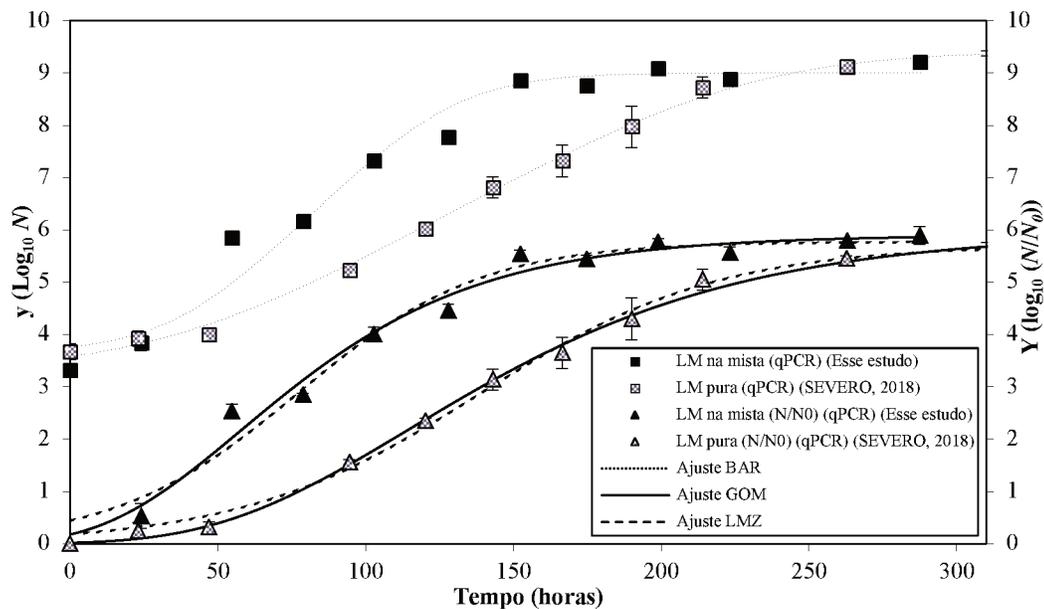
Muitos trabalhos existentes na literatura estudaram o comportamento das BAL presentes em culturas mistas (JANSSEN et al., 2006; ANTWI et al., 2007; ALTIERI et al., 2008; THEVENARD et al., 2011; ACHILLEOS; BERTHIER, 2013, 2017). Nestes trabalhos são avaliados aspectos como a influência das BAL ou com outros tipos de microrganismos, muitas vezes patogênicos ou a interação de BAL benéficas. Entretanto, estudos do comportamento de culturas mistas das espécies *W. viridescens* e *L. mesenteroides* por qPCR e combinados com uma abordagem preditiva não são encontrados na literatura e são importantes para se definir, de forma mais real, a estimativa da vida útil de produtos cárneos. Assim, o desempenho dos modelos preditivos moleculares estabelecidos para descrever o crescimento de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* em cultura mista a 8 °C foi comparado às curvas de crescimento de ambas as espécies em cultura pura, na mesma temperatura, determinadas por SYBR® Green qPCR (Figuras 7.4 e 7.5). Os dados de crescimento de *L. mesenteroides* em cultura pura a 8 °C determinados por SYBR® Green qPCR foram gentilmente cedidos pela MSc. Danielle Severo.

Figura 7.4 - Curvas de crescimento de *W. viridescens* (WV) diferenciada na cultura mista e em cultura pura, ambas determinadas por SYBR[®] Green qPCR a 8 °C ($\pm 0,2$ °C) de incubação e os ajustes dos modelos de BAR (dados do eixo primário), de GOM e LMZ (dados do eixo secundário). As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 7.5 - Curvas de crescimento de *L. mesenteroides* (LM) diferenciada na cultura mista e em cultura pura, ambas determinadas por SYBR[®] Green qPCR a 8 °C ($\pm 0,2$ °C) de incubação e os ajustes dos modelos de BAR (dados do eixo primário), de GOM e LMZ (dados do eixo secundário). As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Como pode ser observado nas Figuras 7.4 e 7.5, os modelos descrevem melhor os dados em cultura pura de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides*, devido ao formato sigmoide das curvas. Além disso, o crescimento de cada espécie na cultura mista foi superior, o que sugere a existência de um efeito levemente sinérgico entre as duas espécies. Esse efeito também foi relatado por Diez et al. (2009a) ao inocularem as espécies *W. viridescens*, *L. mesenteroides* e o cultivo misto dessas duas espécies em *morcilla* de Burgos. Os autores observaram que o crescimento de *W. viridescens* foi mais lento que o de *L. mesenteroides*, inoculado separadamente ou em conjunto (cultura mista) e um possível efeito sinérgico entre essas espécies ocorreu em cultura mista, como também foi confirmado por Vermeiren et al. (2005), em amostras de presunto cozido inoculadas. Esses resultados demonstram a importância dos estudos de modelagem preditiva a partir de dados em cultura mista, pois os modelos preditivos estabelecidos para uma única espécie podem ocasionar uma subestimação do crescimento e não refletir, assim, uma condição real do comportamento de uma microbiota deteriorante. Além disso, modelos preditivos para estudar a evolução dessa microbiota ainda são pouco abordados na literatura, principalmente pelo fato de que essas espécies de BAL são morfologicamente semelhantes e difíceis de serem diferenciadas por métodos convencionais.

Uma possível hipótese para o crescimento superior da cultura mista está relacionada à competição por espaço ou nutriente. Esse fato pode favorecer o crescimento da espécie dominante e, conseqüentemente, o aumento da velocidade de crescimento dessa bactéria. Segundo Achilleos e Berthier (2017), para detectar bactérias e avaliar a diversidade de uma microbiota, os métodos tradicionais dependentes de cultura estão sendo substituídos por métodos independentes de cultura recentes, especialmente métodos baseados em PCR, pois fornecem uma maneira rápida de detectar simultaneamente muitas velocidades de crescimento diferentes em uma única amostra. No entanto, surge a questão de saber se o método de SYBR® Green qPCR combinado com modelos preditivos também podem substituir os métodos dependentes de cultura para a quantificação absoluta dos parâmetros de crescimento de espécies em cultura mista, visando a identificação da espécie dominante no crescimento. Assim, os parâmetros de crescimento da CTB e das culturas de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* na cultura mista são apresentados na Tabela 7.5.

Tabela 7.5 - Parâmetros de crescimento ($\pm 95\%$ IC) estimados pelo ajuste dos modelos de BAR, de GOM e de LMZ aos dados da CTB (obtidos por CP), aos dados de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* em cultura mista, determinados por SYBR[®] Green qPCR, a 8 °C ($\pm 0,2$ °C) de incubação.

Bactéria	$\mu_{m\acute{a}x}$ (1/h)	λ (h)	<i>A</i> ou $y_{m\acute{a}x}$ (log ₁₀ UFC/mL) ^a
	Modelo de Baranyi e Roberts (BAR)		
CTB ^b	0,041 ($\pm 0,001$)	27,51 ($\pm 0,916$)	9,305 ($\pm 0,098$)
<i>W. viridescens</i>	0,043 ($\pm 0,004$)	53,54 ($\pm 6,016$)	9,142 ($\pm 0,303$)
<i>L. mesenteroides</i>	0,059 ($\pm 0,005$)	39,18 ($\pm 4,082$)	8,982 ($\pm 0,195$)
Modelo de Gompertz Modificado (GOM)			
CTB ^b	0,041 ($\pm 0,003$)	22,59 ($\pm 5,690$)	6,439 ($\pm 0,198$)
<i>W. viridescens</i>	0,034 ($\pm 0,006$)	10,26 ($\pm 15,26$)	6,388 ($\pm 0,577$)
<i>L. mesenteroides</i>	0,047 ($\pm 0,005$)	11,90 ($\pm 7,410$)	5,902 ($\pm 0,188$)
Modelo Logístico Modificado por Zwietering (LMZ)			
CTB ^b	0,042 ($\pm 0,003$)	29,29 ($\pm 6,325$)	6,196 ($\pm 0,156$)
<i>W. viridescens</i>	0,035 ($\pm 0,006$)	19,38 ($\pm 15,23$)	6,060 ($\pm 0,383$)
<i>L. mesenteroides</i>	0,047 ($\pm 0,007$)	15,31 ($\pm 9,965$)	5,774 ($\pm 0,192$)

^aParâmetro *A* para os modelos GOM e LMZ e $y_{m\acute{a}x}$ para o modelo BAR.

^bContagem total de BAL pelo método de CP, sem diferenciação das colônias.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Como pode ser observado na Tabela 7.5, as velocidades máximas específicas de crescimento $\mu_{m\acute{a}x}$ de *L. mesenteroides* em cultivo misto são superiores às de *W. viridescens* e da CTB quando estimadas pelos três modelos. Além disso, *W. viridescens* apresentou valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0,034 (1/h) e 0,035 (1/h) inferiores aos obtidos para a CTB quando estimados pelos modelos de GOM e LMZ, respectivamente. Camargo (2015) relatou que os valores do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ para *W. viridescens* ($\mu_{m\acute{a}x} = 0,78$ (1/h)) e para *L. sakei* ($\mu_{m\acute{a}x} = 0,78$ (1/h)) em cultura pura foram superiores quando essas espécies foram cultivadas em cultura mista (CTB, $\mu_{m\acute{a}x} = 0,76$ (1/h)) a 30 °C. No entanto, esses resultados não identificaram a cinética de crescimento individual de cada uma das BAL, impossibilitando a diferenciação das espécies. Ainda na Tabela 7.5, é possível notar que os valores da velocidade de crescimento da CTB aproximam-se de uma média ponderada em relação aos parâmetros individuais das espécies *W. viridescens* e *L. mesenteroides* para os modelos de GOM e LMZ.

Para uma melhor visualização da subdivisão das espécies em cultivo misto a 8 °C, os valores dos parâmetros de crescimento estimados pelo ajuste do modelo de BAR são apresentados na Tabela 7.6.

Tabela 7.6 – Subdivisão das cepas baseada nos parâmetros de crescimento, estimados pelo ajuste do modelo de BAR em cultivo misto a 8 °C.

Bactéria	$\mu_{m\acute{a}x}$ (1/h)	$y_{m\acute{a}x}$ (log ₁₀ UFC/mL)	TAFE (h)*	Classe
<i>L. mesenteroides</i>	0,059 (± 0,005)	8,982 (± 0,195)	152	Dominante
<i>W. viridescens</i>	0,043 (± 0,004)	9,142 (± 0,303)	175	Subdominante

*TAFE é o tempo para atingir a fase estacionária (horas) determinado a partir da linha de ajuste do modelo de BAR.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

De acordo com a Tabela 7.6, o coquetel de *W. viridescens* em cultivo misto foi subdominante, com valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ menores, porém continuou o crescimento quando a cepa *L. mesenteroides* atingiu a fase estacionária. O coquetel de *W. viridescens* atingiu a fase estacionária mais lentamente, mas alcançou uma concentração máxima alta ($y_{m\acute{a}x} = 9,142 \log_{10}$ UFC/mL estimado pelo modelo de BAR). Esses resultados corroboram com os relatados por Diez et al. (2009a,b,c), nos quais a espécie de *W. viridescens* apresentou um crescimento mais lento quando inoculada com *L. mesenteroides* em *morcilla* a 4 °C, considerando as alterações microbianas, sensoriais e voláteis identificadas por testes fenotípicos e ribotipagem. Cauchie et al. (2017) verificaram que a espécie *L. mesenteroides* foi subdominante quando cultivada com *Carnobacterium maltaromaticum* a 8 °C, mesmo com valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ iguais ($\mu_{m\acute{a}x} = 0,1$ (1/h)), porém *C. maltaromaticum* atingiu a fase estacionária em menor tempo (8 dias) em comparação a *L. mesenteroides* (10 dias). Isso destaca a importância de relacionar todos os parâmetros de crescimento para subdividir a evolução das bactérias deteriorantes.

Os modelos preditivos convencionais para as curvas de crescimento da CTB e os modelos preditivos moleculares para as curvas de crescimento de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides* em cultura mista foram avaliados pelos índices R^2_{aj} , RMSE, F_T e F_E (Tabela 7.7).

Tabela 7.7 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste dos modelos de BAR, de GOM e LMZ aos dados experimentais da CTB pelo método de CP, do coquetel de *W. viridescens* e da cultura de *L. mesenteroides* pelo método de SYBR® Green qPCR em cultivo misto armazenado a 8 °C ($\pm 0,2$ °C).

Bactéria	Modelo	Índices estatísticos			
		R^2_{aj}	RMSE	F_T	F_E
CTB ^a	BAR	0,996	0,147	1,001	1,018
	GOM	0,992	0,198	0,994	1,047
	LMZ	0,991	0,213	1,015	1,079
<i>W. viridescens</i>	BAR	0,951	0,468	1,004	1,058
	GOM	0,951	0,467	0,985	1,103
	LMZ	0,955	0,450	0,984	1,103
<i>L. mesenteroides</i>	BAR	0,965	0,396	1,004	1,042
	GOM	0,983	0,274	1,018	1,073
	LMZ	0,975	0,336	1,024	1,093

^aContagem total de BAL pelo método de CP, sem diferenciação das colônias.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Os índices estatísticos apresentados na Tabela 7.7 demonstram que os modelos primários convencionais apresentaram bons ajustes às curvas de crescimento da CTB, com valores de $R^2_{aj} \geq 0,991$, $RMSE \geq 0,147$, $F_T \geq 0,994$ e $F_E \geq 1,018$. Além disso, os modelos preditivos moleculares apresentaram melhor desempenho ao descrever a curva de crescimento de *L. mesenteroides* em cultura mista em comparação com *W. viridescens*. Esse fato pode ser explicado pela formação de uma fase de latência intermediária maior no crescimento de *W. viridescens* em comparação à espécie dominante, *L. mesenteroides*, como já citado anteriormente.

Para explicar o desempenho dos modelos preditivos, uma analogia entre os fatores extrínsecos e intrínsecos pode ser realizada. Por exemplo, Longhi (2012) constatou que o desempenho de modelos preditivos é menor quando ocorrem variações bruscas de temperatura, especialmente sob refrigeração, pois os modelos não podem prever os complexos mecanismos de adaptação microbiana. Enquanto nesse estudo foi constatado que o menor desempenho dos modelos preditivos moleculares pode estar relacionado às interações entre as espécies dominante e subdominante em cultivo misto. Desta forma, a aplicação de novos métodos de identificação e quantificação específica de BAL deteriorantes em diferentes condições de temperatura e de interação, bem como a incorporação dessas informações nos modelos matemáticos torna-se um grande desafio para a microbiologia preditiva.

Nos últimos anos, cientistas que estudam a segurança de alimentos altamente perecíveis têm focado seus trabalhos na detecção e controle de microrganismos patogênicos. Ye et al. (2013) desenvolveram um modelo preditivo por qPCR para descrever o crescimento do patógeno *Listeria monocytogenes* em carne de porco refrigerada e embalada a vácuo. Noviyanti et al. (2018) modelaram o crescimento de *Salmonella* Enteritidis em caldo de frango, utilizando o qPCR, para obtenção dos dados de crescimento. No entanto, também se torna importante a inclusão dos produtos impróprios para consumo humano na definição de alimentos não seguros, devido à contaminação, deterioração, decomposição ou apodrecimento. Além disso, o uso de um método de SYBR® Green qPCR para a modelagem preditiva do crescimento de um coquetel de cepas de *W. viridescens* deteriorantes de produtos cárneos em cultura pura e mista com qualquer outra espécie ainda não foi estabelecido na literatura.

O estabelecimento de modelos preditivos moleculares poderia ajudar na compreensão de protocolos de detecção quantitativa, com diferenciação da microbiota, para prever a vida útil com maior precisão, garantindo a qualidade dos produtos cárneos. No entanto, os experimentos em cultura mista em meio de cultivo apresentados nessa seção devem ser vistos como uma pré-seleção dessas espécies para os experimentos em produto cárneo como alimento modelo, conforme apresentados na Seção 8.

7.4 CONCLUSÕES

Os modelos de Baranyi e Roberts, de Gompertz modificado e Logístico modificado apresentaram boa capacidade de descrever o crescimento de um coquetel de *W. viridescens* a 4, 8, 14 e 30 °C para os métodos de SYBR® Green qPCR e de CP.

As fases de latência e exponencial foram evidentes em todos os modelos, e os cultivos armazenados em baixas temperaturas tiveram fases de latência mais longas e menores velocidades de crescimento do que aqueles em altas temperaturas, dentro da faixa estudada.

Os valores dos índices estatísticos dos ajustes do modelo de BAR aos dados moleculares foram melhores que os modelos de GOM e LMZ para todas as temperaturas, e o modelo secundário Exponencial representou bem a influência da temperatura no parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$, para todos os modelos moleculares e convencionais.

Os modelos preditivos moleculares apresentaram melhor desempenho ao descrever a curva de crescimento de *L. mesenteroides* em cultura mista em comparação com *W. viridescens*. Esse fato pode ser explicado pela interação entre as espécies, com a formação de uma fase de latência intermediária maior no crescimento da espécie subdominante, *W. viridescens*, em comparação à espécie dominante, *L. mesenteroides*.

8. USO COMBINADO DOS MÉTODOS DE TaqMan™ qPCR E CONTAGEM EM PLACAS PARA PREDIZER O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS EM PRODUTO CÁRNEO EMBALADO A VÁCUO

Os resultados deste estudo foram desenvolvidos nos laboratórios do Departamento de Biotecnologia e Ciência de Alimentos da Universidade de Burgos, Espanha, sob a orientação dos professores Ana Maria Diez Mate e Jordi Rovira Carballido. A bolsa de doutorado sanduíche foi concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo nº 88881.132374 / 2016-01.

8.1 MATERIAL E MÉTODOS

8.1.1 Microrganismos

Dez linhagens diferentes das espécies microbianas *L. mesenteroides* e *W. viridescens* foram utilizadas neste estudo conforme listado na Tabela 8.1. Duas cepas de referência foram fornecidas pela Coleção de Culturas do Tipo Espanhol (CECT) (Valência, Espanha). Oito cepas de isolados alimentares foram coletadas da MB (DIEZ et al., 2009a; SANTOS et al., 2005b). Exclusivamente nesta seção, os nomes das espécies *L. mesenteroides* e *W. viridescens* serão abreviadas como *LM* e *WV*, respectivamente

Na Tabela 8.1, as cepas identificadas por *L* e *W* foram isoladas a partir de diferentes tempos de armazenamento de *morcilla*. Por exemplo, as cepas *W₈* e *L₈* foram isoladas após oito dias de armazenamento a 4 °C. As suspensões das dez cepas foram mantidas, individualmente, congeladas a -80 °C em caldo MRS (DE MAN et al., 1960) (Sigma-Aldrich, Inc.) suplementado com 30% de glicerol.

Tabela 8.1 - Cepas bacterianas usadas neste estudo.

Espécies	Identificação	Origem
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (LM)	CECT 219 ^T (ATCC 8293)	Azeitonas fermentadas
	66 ^a	<i>Morcilla</i>
	L ₁ ^b	<i>Morcilla</i>
	L ₈ ^b	<i>Morcilla</i>
	L ₃₅ ^b	<i>Morcilla</i>
<i>Weissella viridescens</i> (WV)	CECT 283 ^T (ATCC 12706)	Produtos cárneos curados
	132 ^a	<i>Morcilla</i>
	W ₁ ^b	<i>Morcilla</i>
	W ₈ ^b	<i>Morcilla</i>
	W ₃₅ ^b	<i>Morcilla</i>

^TCepas tipo: CECT, Coleção de Culturas do Tipo Espanhol ou ATCC, Coleção de Culturas Tipo Americana.

^aCepas isoladas e identificadas por Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (RFLP) em estudo reportado por Santos et al. (2005b).

^bCepas isoladas e identificadas por RFLP em estudo reportado por Diez et al. (2009a).

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

8.1.2 Preparo dos inóculos

Para o preparo dos inóculos, suspensões de cada cepa foram descongeladas e 100 µL foram transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo MRS, os quais foram incubadas a 30 °C por 24 h e subcultivadas no dia seguinte. A subcultura foi cultivada por 18 h até a fase estacionária de crescimento (resultados anteriores). Prepararam-se dois coquetéis, um com todas as cinco cepas de *LM* e outro com todas as cinco cepas de *WV*, nos quais foram transferidos 2 mL de cada, para obter 10 mL dos dois inóculos com concentração de 10⁹ UFC/mL.

8.1.3 Preparação das amostras de MB artificialmente inoculadas

Amostras de *morcilla* fatiadas em rodela (aproximadamente 20 g) foram recebidas de um fabricante da cidade de Burgos, Espanha, no dia da produção, e armazenadas a 4 °C. Amostras individuais de tamanho padronizado foram, então, embaladas a vácuo e pasteurizadas a 75 °C por 10 min em um banho termostático com agitação horizontal (Unitronic 320 DR, JP Selecta, Espanha) a fim de reduzir a microbiota natural do produto (DIEZ et al., 2009a; 2009b). Após o

tratamento de pasteurização, cada amostra foi inoculada, artificialmente, com 200 µL de inóculo contendo, aproximadamente, 10^5 UFC/mL de *LM* ou de *WV* em duplicata, com o objetivo de atingir concentrações aproximadas de 1×10^3 UFC/g que, em seguida, foi embalada a vácuo. Um volume de 200 µL de água estéril foi adicionado, em duplicata, às amostras controle não inoculadas (controle negativo).

8.1.4 Condições de armazenamento e medidas de crescimento

Amostras de MB artificialmente inoculadas foram incubadas, isotermicamente, a 5, 8, 13 e 18 °C. Essas quatro temperaturas foram testadas com a finalidade de reproduzir as diferentes condições de armazenamento de alimentos refrigerados. As temperaturas 5 e 8 °C foram escolhidas com base em Breen et al. (2006) e Hassan e Dimassi (2014), respectivamente, que as consideraram como as temperaturas médias dos refrigeradores domésticos. A temperatura de abuso moderada, 13 °C, foi escolhida com base em Johnson et al. (1998). Gilbert et al. (2007) e Brennan et al. (2013) consideraram que 18 °C é a temperatura máxima, ou temperatura grave de abuso, dos refrigeradores domésticos. A temperatura em torno das amostras foi registrada por *data logger* EBI 20-TH1 (Ebro, Alemanha). O crescimento microbiano foi medido, em duplicata, por TaqMan™ qPCR e CP, até a fase estacionária de crescimento.

Para determinar o tempo de vida útil para MB, esse período foi definido como o tempo necessário para atingir níveis de 10^7 UFC/g, critério descrito por vários autores para diferentes produtos cárneos, bem como para MB (VERMEIREN et al., 2005; DIEZ et al., 2008a; 2009c; IRKIN et al., 2011; SLONGO et al., 2009).

8.1.5 Quantificação de *LM* ou *WV*

Amostras de MB artificialmente inoculadas foram analisadas em diferentes dias, de acordo com as temperaturas usadas em cada experimento ao longo do período de incubação. Foram colocados 20 g do produto em sacos plásticos de homogeneização estéreis e com filtro lateral. A cada saco, foram adicionados 180 mL da solução de Ringer (solução de diluição), na qual as amostras foram homogeneizadas por 2 min com um *Stomacher* (Smasher™ Lab Blender, Weber

Scientific, EUA). A partir dessa suspensão inicial, outros passos foram realizados, como descritos a seguir.

8.1.5.1 Quantificação pelo método de CP

Diluições decimais em solução de Ringer foram preparadas para análise microbiológica. Alíquotas de 100 μ L das diluições apropriadas foram plaqueadas em superfície de ágar MRS, em duplicata, a 30 °C por 48 h, usando o método especificado pela *International Organization for Standardization* – ISO 15214:1998 (ANONYMOUS, 1998). As amostras-controle não inoculadas foram analisadas no primeiro e no último dia para verificar a ausência de contaminantes. Foi calculada a média e o erro médio (UFC/g) de duas amostras independentes de cada ponto da curva de crescimento e utilizada para determinar a cinética de crescimento. A contagem inicial (tempo zero) das cepas em MB foi determinada por CP em MRS após a inoculação.

8.1.5.2 Quantificação pelo método de qPCR

8.1.5.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA das espécies inoculadas artificialmente em MB foi extraído, em duplicata, usando suspensão celular de 40 mL de homogeneizado, que foi centrifugado (Centrifuge 5810R, Eppendorf) a 300 \times g por 10 min (4 °C) e as células foram, subsequentemente, coletadas por centrifugação a 5000 \times g por 15 min (4 °C) e o seu DNA genômico foi isolado utilizando o GenElute™ Kit (*Bacterial Genomic DNA Kit*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), de acordo com as recomendações do fabricante para bactérias Gram-positivas. O DNA extraído foi suspenso em 100 μ L de solução tampão recomendada e quantificado em espectrofotômetro (BioTek™ Epoch) (NANODROP TECHNOLOGIES, 2007).

8.1.5.2.2 Condições de amplificação

As reações de TaqMan™ qPCR foram realizadas em tiras ópticas de oito tubos MicroAMP® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), por meio do sistema de detecção StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems).

De acordo com Elizaquível, Chenoll e Aznar (2008) e Gómez-Rojo et al. (2015), foram utilizados iniciadores e sondas para identificar e quantificar a presença de *LM* ou de *WV* em MB por TaqMan™ qPCR, respectivamente, conforme listados na Tabela 8.2. As reações de amplificação foram realizadas, em duplicata, em um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de 1 × FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), o par de iniciadores, a sonda TaqMan™, água livre de *nuclease* e 2 µL de DNA molde. As reações de amplificação de *LM* foram: 10 min a 95 °C, seguido de 45 ciclos durante 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e uma extensão final durante 5 min a 72 °C. As reações de amplificação de *WV* foram: 5 min a 95 °C, seguido por 45 ciclos por 1 min a 95 °C, 30 s a 64 °C, 30 s a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C.

8.1.5.2.3 Curvas-padrão de *LM* ou *WV* em MB

As curvas-padrão foram estabelecidas para quantificação de *LM* ou *WV* em MB. As amostras, artificialmente inoculadas, foram preparadas da seguinte forma: 40 g de *morcilla* foram cortadas, assepticamente, em rodela e embaladas a vácuo em uma máquina de embalagem EVT-7CD (Tecnotrip, Tarrasa, Espanha). As embalagens, contendo as amostras de MB, foram pasteurizadas (descrito no item 8.2.3) para eliminar todos os microrganismos contaminantes; sendo que esse tratamento se mostrou eficaz em estudos anteriores (DIEZ et al., 2009a; 2009b). Após a etapa de pasteurização, as amostras foram homogeneizadas em 360 mL de solução de Ringer em um saco plástico de homogeneização estéril e com filtro lateral (Interscience, BagPage®, França) por 2 min com um *Stomacher* (Smasher Lab Labender, Weber Scientific, EUA). A mistura resultante foi retirada do lado do filtro, para evitar materiais sólidos, e distribuída em alíquotas de 40 mL, que foram inoculadas com 10 diluições seriadas do inóculo, conforme metodologia descrita por Elizaquível et al. (2008) e Gómez-Rojo et al. (2015). A concentração de cada alíquota foi determinada por CP em ágar MRS, correspondente a uma concentração final de $1,3 \times 10^2$ a $1,3 \times 10^8$ UFC/g para *LM* e de $4,3 \times 10^1$ a $4,3 \times 10^8$ UFC/g para *WV*.

Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes para cada cepa, calculando-se a média dos valores de C_T e o Desvio-Padrão (DP) para cada ponto da curva em seis replicatas de qPCR. As curvas-padrão foram construídas ao se plotar os valores médios de C_T em função do \log_{10} UFC por grama de MB artificialmente inoculada com *LM* ou *WV*. Além disso, a água livre de *nuclease* e uma porção não inoculada de amostras de MB foram analisadas como um controle negativo, em duplicata, por qPCR. Para o cálculo da equação da curva-padrão, apenas os dados com coeficiente de variação (CV) < 33% foram considerados (ŽEL et al., 2012). As eficiências de amplificação foram determinadas mediante a Equação 5.1. Os valores de LoD e de LoQ foram determinados conforme descrito no item 5.1.4.3.5 da Seção 5.

Tabela 8.2 - Iniciadores de oligonucleotídeos utilizados nas ampliações de TaqMan™ qPCR.

Espécie	Gene	Iniciador	Sequência (5' → 3')	Posição	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Referência
<i>LM</i>	<i>23S rRNA</i>	LcmesS	CCA GTT GTA ATG CGT TAT TAC C	1956	130	Elizaquível, Chenoll e Aznar (2008)
		LcmesA	CAC AGC TTG TCC TTA TAG AAA A	2082		
		Sonda TaqMan™	FAM-TTCACTCTTTTCAAGACTTACTG-MGB	2031		
<i>WV</i>	<i>RecN</i>	WvrecNF	CGC AAA CAC AAC AAG CCT AT	908	91	Gómez- Rojo et al. (2015)
		WvrecNR	TGT TGA GCA AGT TCC AAA GC	998		
		Sonda TaqMan™	FAM-CCGTGCCCTGACGTTAGCCA-BHQ1	930		

FAM: *fluorescein amidite*; MGB: *minor groove binder*; BHQ: *Quenchers Black Hole*.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

8.1.5.2.4 Método de TaqMan™ qPCR para MB artificialmente inoculada

O DNA total das espécies inoculadas em MB foi isolado a partir de 1 mL de cada suspensão inicial, conforme descrito no item 8.2.5.2.1. O método de TaqMan™ qPCR foi realizado com o DNA molde extraído (ver item 8.2.5.2.2 acima). As contagens bacterianas (UFC/g) de *LM* ou de *WV* em MB durante o armazenamento, estimadas por TaqMan™ qPCR, foram determinadas usando a Equação 8.1 proposta por Ilha et al. (2016). Nessa equação, *A* é o UFC por reação, obtido do C_T da amostra de DNA usando a curva-padrão (C_T versus \log_{10} UFC) (item 8.2.5.2.2), *B* é a concentração de DNA extraído (ng/ μ L), *C* é o volume total de DNA extraído (μ L), *D* é a massa de DNA na reação (ng), e *E* é a massa de MB (g) usada para a extração de DNA.

$$\text{UFC/g} = \frac{A \times B \times C}{D \times E} \quad (8.1)$$

8.1.6 Análise estatística comparativa dos métodos

Os dados da concentração microbiana foram transformados em logaritmo na base dez (\log_{10}) e as linhas de tendência da regressão linear entre os métodos de TaqMan™ qPCR e de CP foram avaliadas de acordo com Passing e Bablok (1983), usando o MedCalc v17.1 (MedCalc Software, Bélgica). Os coeficientes de determinação (R^2) das regressões lineares foram obtidos. Os limites de concordância entre os dois métodos de quantificação foram avaliados usando o GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Prism® Software, EUA), de acordo com as abordagens estatísticas propostas por Bland e Altman (1986). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

8.1.7 Modelagem preditiva

8.1.7.1 Modelagem primária

O modelo primário de Baranyi e Roberts (BAR) (BARANYI; ROBERTS, 1994) (Equações 7.3 a 7.5 da Seção 7) foi selecionado para esse estudo por apresentar melhores ajustes aos dados de crescimento apresentadas na Seção 7. Assim, esse modelo foi ajustado aos dados

de crescimento de *LM* ou de *WV* em MB obtidos por TaqMan™ qPCR e por CP, sob condições isotérmicas. O modelo BAR representa um modelo de crescimento biológico mais usado na literatura e já foi utilizado por vários autores, como Gospavic et al. (2008), Tremarin et al. (2015) e Lytjou et al. (2016).

8.1.7.2 Modelagem secundária

Os modelos secundários Exponencial e Raiz quadrada (RATKOWSKY et al., 1982) (Equação listadas no item 7.2.1.2 da Seção 7) foram usados para descrever o efeito da temperatura na velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$).

8.1.7.3 Análises numéricas

O procedimento de ajuste do modelo primário e dos modelos secundários aos dados experimentais foi realizado em *software* Matlab R2013a (MathWorks®, Natick, EUA). Para o modelo BAR, a estimativa dos parâmetros foi realizada em modelagem em duas etapas (MDE), como descrito no item 7.2.2 da Seção 7.

8.1.7.4 Avaliação do desempenho dos modelos

Para avaliar o desempenho dos modelos, o Coeficiente de Determinação Ajustado (R^2_{aj}), a Raiz do Erro Quadrático Médio (RMSE, log UFC/g), o Fator de tendência (F_T) e o Fator de Exatidão (F_E) foram calculados, conforme as equações descritas no item 7.2.3 da Seção 7.

8.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.2.1 Curvas-padrão para MB

Os gráficos da amplificação correspondentes às curvas-padrão estão representados nas Figuras 8.1a e 8.2a. As curvas-padrão são demonstradas, graficamente, como uma equação da curva de regressão e um coeficiente de determinação R^2 dos valores médios de C_T em função

do log UFC/g de MB artificialmente inoculada com *WV* ou *LM*, conforme as Equações 8.2 e 8.3, respectivamente.

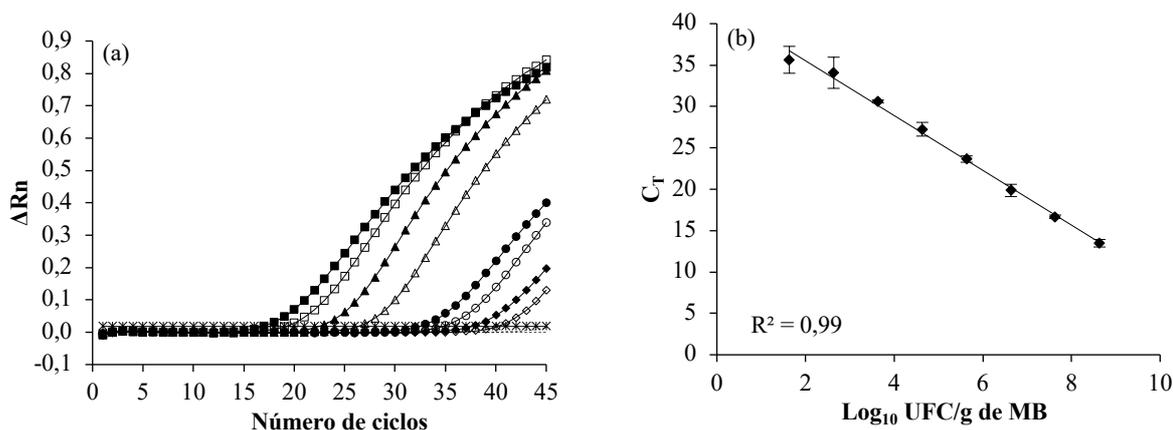
$$C_T = -3,31 \times (\log_{10} \text{UFC/g}) + 42,13 \quad (8.2)$$

$$C_T = -3,51 \times (\log_{10} \text{UFC/g}) + 41,73 \quad (8.3)$$

O controle negativo (MB não inoculada) exibiu ausência de colônias de BAL em MRS após 48 h de incubação. Além disso, não foi observado qualquer sinal de amplificação. As eficiências de amplificação (*E*), calculadas usando suspensões de coquetel de células de *LM* e *WV* como modelos, foram 93% e 101%, respectivamente. Todas as curvas-padrão demonstraram uma boa linearidade entre \log_{10} UFC/g e C_T , com um valor de R^2 de 0,99 (Figuras 8.1b e 8.2b). Os coeficientes de variação relevantes ($CV < 33\%$) (dos valores de C_T de dois experimentos independentes em seis reações, ver Tabela 8.3), variando entre 0,58% e 6,55% demonstraram a alta precisão e reprodutibilidade do método de TaqMan™ qPCR. A partir das informações descritas, confirma-se a confiabilidade desse método para a quantificação de *LM* e *WV* em MB. Além disso, ao comparar a equação da curva-padrão obtida para *WV* em MB (Equação 8.2) com a média das equações das curvas-padrão de *WV* em meio de cultivo ($C_T = -3,32 \times (\log_{10} \text{UFC/mL}) + 37,16$) (Seção 6), é possível verificar uma proximidade na eficiência das curvas, demonstrando a confiabilidade do método de qPCR para a quantificação de *WV* tanto em meio de cultivo como em produto cárneo.

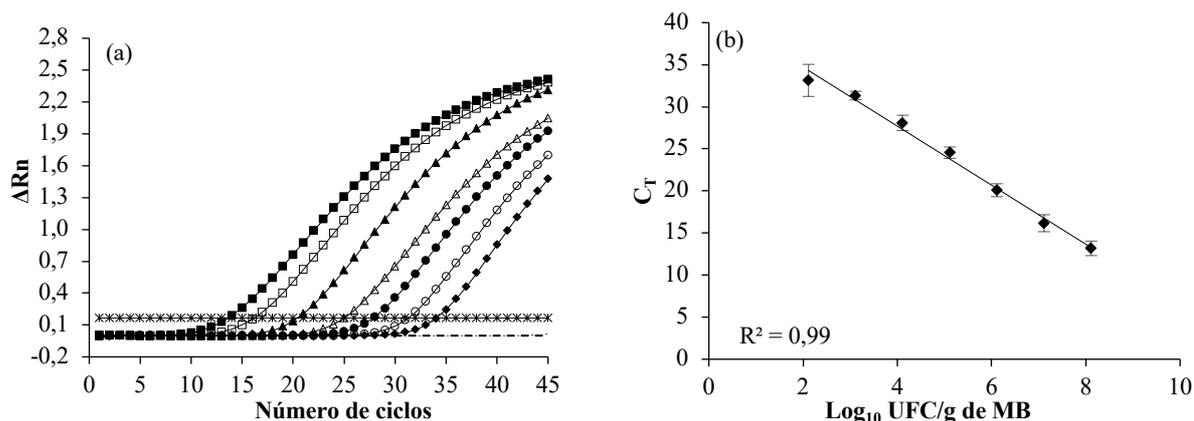
Os valores de LOD foram estabelecidos em 9,4 UFC/reação ($1,3 \times 10^2$ UFC/g) e 3,1 UFC/reação ($4,3 \times 10^1$ UFC/g) de *LM* e *WV*, respectivamente (Tabela 8.3), considerando o volume do tampão de eluição. Os valores de LOQ foram estabelecidos em $1,3 \times 10^3$ UFC/g e $4,3 \times 10^2$ UFC/g de *LM* e *WV*, respectivamente. Por consequência, uma faixa de detecção para *LM* de $1,3 \times 10^2$ para o nível máximo testado de $1,3 \times 10^8$ UFC/g e para *WV* de $4,3 \times 10^1$ para o nível máximo testado de $4,3 \times 10^8$ UFC/g em MB foram estabelecidas (Tabela 8.3).

Figura 8.1 - Gráficos representativos de amplificação e curva-padrão. a) Aumento da fluorescência (ΔRn) em relação ao número de ciclos de TaqMan™ qPCR para diluições em séries de um coquetel de *WV* correspondente a $4,3 \times 10^8$ (-■-), $4,3 \times 10^7$ (-□-), $4,3 \times 10^6$ (-▲-), $4,3 \times 10^5$ (-△-), $4,3 \times 10^4$ (-●-), $4,3 \times 10^3$ (-○-), $4,3 \times 10^2$ (-◆-), $4,3 \times 10^1$ (-◇-) CFU/g, amostra controle (-) e limiar (-x-). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T para seis execuções de TaqMan™ qPCR em duas ampliações independentes em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de *WV*. As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 8.2 - Gráficos representativos de amplificação e curva-padrão. (a) Aumento da fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos de TaqMan™ qPCR para diluições em séries de um coquetel de *LM* correspondente a $1,3 \times 10^8$ (-■-), $1,3 \times 10^7$ (-□-), $1,3 \times 10^6$ (-▲-), $1,3 \times 10^5$ (-△-), $1,3 \times 10^4$ (-●-), $1,3 \times 10^3$ (-○-), $1,3 \times 10^2$ (-◆-) UFC/g, amostra controle (-) e limiar (-x-). (b) Curva-padrão construída pela plotagem dos valores médios de C_T para seis execuções de TaqMan™ qPCR para duas ampliações independentes em função do logaritmo da concentração de células em UFC (determinada por CP) de *LM*. As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Tabela 8.3 - Resultados de quantificação obtidos pelo método TaqMan™ qPCR em MB artificialmente inoculada com um coquetel de *Weissella viridescens* (*WV*) e *Leuconostoc mesenteroides* (*LM*).

UFC/g em MB ^a	UFC/reação	C _T (média ± DP) ^b		CV (%) ^c
		<i>Weissella viridescens</i> (<i>WV</i>)		
4,3 × 10 ⁸	3,1 × 10 ⁷	13,5 ± 0,5		3,38
4,3 × 10 ⁷	3,1 × 10 ⁶	16,7 ± 0,2		1,23
4,3 × 10 ⁶	3,1 × 10 ⁵	19,9 ± 0,7		3,72
4,3 × 10 ⁵	3,1 × 10 ⁴	23,6 ± 0,4		1,62
4,3 × 10 ⁴	3,1 × 10 ³	27,2 ± 0,8		3,04
4,3 × 10 ³	3,1 × 10 ²	30,6 ± 0,2		0,58
4,3 × 10 ²	31	34,1 ± 1,9		5,53
4,3 × 10 ¹	3,1	35,6 ± 1,6		4,56
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (<i>LM</i>)		
1,3 × 10 ⁸	9,4 × 10 ⁶	13,2 ± 0,9		6,55
1,3 × 10 ⁷	9,4 × 10 ⁵	16,2 ± 1,0		6,25
1,3 × 10 ⁶	9,4 × 10 ⁴	20,1 ± 0,8		3,83
1,3 × 10 ⁵	9,4 × 10 ³	24,5 ± 0,7		2,76
1,3 × 10 ⁴	9,4 × 10 ²	28,1 ± 0,9		3,23
1,3 × 10 ³	94	31,3 ± 0,5		1,62
1,3 × 10 ²	9,4	33,1 ± 1,9		5,75

^aObtido a partir das contagens em placas.

^bValores médios de C_T obtidos para seis execuções de TaqMan™ qPCR de dois experimentos independentes de amplificação. DP, desvio-padrão.

^cCV: coeficiente de variação.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Comparado com o ensaio de TaqMan™ qPCR desenvolvido para cultura pura, a sensibilidade obtida nesse trabalho, como por exemplo para *W. viridescens* de 4,3 × 10¹ UFC/g, é maior do que os relatados para quantificação de BAL em produtos cárneos, por exemplo, *L. sakei* (3 × 10³ UFC/g) (MARTÍN et al., 2006), *LM* (1,8 × 10⁴ UFC/g) (ELIZAQUÍVEL; CHENOLL; AZNAR, 2008) e *WV* (10³ UFC/g) (GÓMEZ-ROJO et al., 2015). Assim, esse método pode ser utilizado para a detecção e quantificação de *LM* e *WV* presentes em produtos cárneos cozidos. Contudo, coloca-se a questão de saber se as curvas-padrão construídas neste trabalho podem ser utilizadas para a quantificação dessas bactérias em MB em diferentes fases de crescimento (latência, exponencial e estacionária) e em temperaturas de armazenamento variadas. Portanto, os métodos de TaqMan™ qPCR e de CP foram avaliados para quantificar *LM* ou *WV* em amostras de MB artificialmente inoculadas e armazenadas em diferentes condições isotérmicas até a fase de crescimento estacionária. Posteriormente, o modelo de BAR foi ajustado aos dados da curva de crescimento para se estimar os parâmetros cinéticos de *LM* ou de *WV*. Modelos secundários foram usados para estabelecer a dependência da velocidade máxima específica de crescimento com a temperatura.

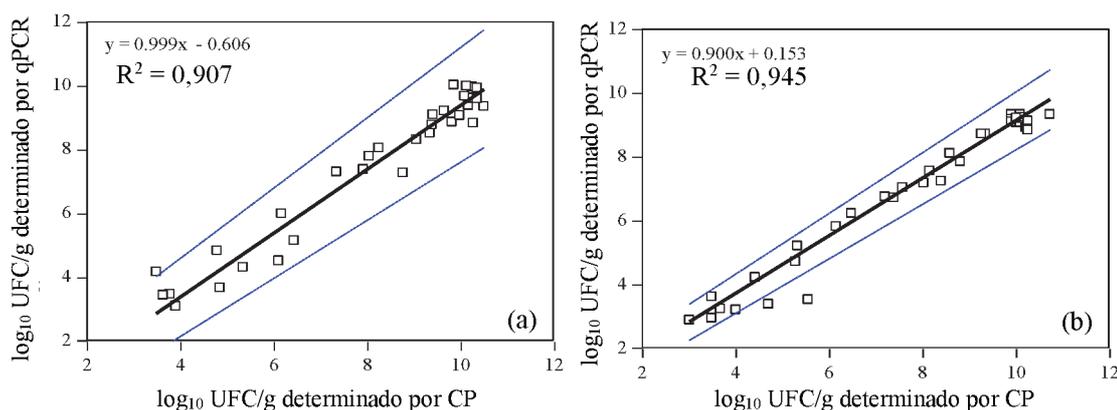
8.2.2 Comparação entre dados de crescimento obtidos pelos métodos TaqMan™ qPCR e CP

As contagens de *LM* e de *WV* enumeradas por TaqMan™ qPCR, usando as curvas-padrão (Figuras 8.1b e 8.2b), foram comparadas às contagens enumeradas por CP em placas com MRS em MB armazenadas a 5, 8, 13 e 18 °C até a fase estacionária de crescimento (valores médios). A análise de regressão linear demonstrou uma correlação significativa, com valores de R^2 de 0,945 e 0,907 para *LM* e *WV*, respectivamente ($p < 0,0001$; Figura 8.3). Além disso, os gráficos de Bland-Altman foram construídos a fim de investigar se houve concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos (Figura 8.4). A análise estatística revelou que a maioria das amostras estavam dentro dos limites do intervalo de confiança (IC) de 95 % ($\pm 1,96$ DP); no entanto, o método de CP forneceu um valor mais alto (0,73 \log_{10} UFC para *LM* e 0,59 \log_{10} UFC para *WV*) em comparação ao método de TaqMan™ qPCR. A concordância nos resultados obtidos pelos dois métodos para amostras de MB artificialmente inoculadas foi adequada, embora o TaqMan™ qPCR tenha subestimado ligeiramente os valores de \log_{10} UFC por CP. Essa observação já fora descrita por Krämer et al. (2011).

Segundo Reichert-Schwillinsky et al. (2009), os padrões de quantificação de TaqMan™ qPCR, relacionados ao número de UFC determinados na cultura utilizada para o isolamento de DNA, podem adicionar um viés à análise, a depender do estado fisiológico da população bacteriana presente na cultura. As BAL sob condições de estresse, como elevada acidez devido ao acúmulo de ácido láctico, sofrem alterações fisiológicas (EVEN et al., 2002), que acarretam a uma menor replicação do DNA da célula (GRATTEPANACHE et al., 2005). No entanto, as células podem retornar a um estado fisiológico sem estresse durante as etapas de preparação da amostra para as contagens em placas e, assim, a diminuição da concentração bacteriana pode não ser detectada em placas de ágar (GRATTEPANACHE et al., 2005) e, assim, aumentaria a discrepância entre os métodos dependentes e independentes de cultura. Além disso, a subestimação do método de TaqMan™ qPCR poderia resultar de uma extração incompleta de DNA, como evidenciado por Achilleos e Berthier (2013), ou de uma amplificação menos eficiente do DNA extraído, independentemente da presença de um inibidor na matriz da amostra, como proposto por Kemp et al. (2014), embora o método de extração tenha sido ideal para extração de DNA de *morcilla* (GÓMEZ-ROJO et al., 2015).

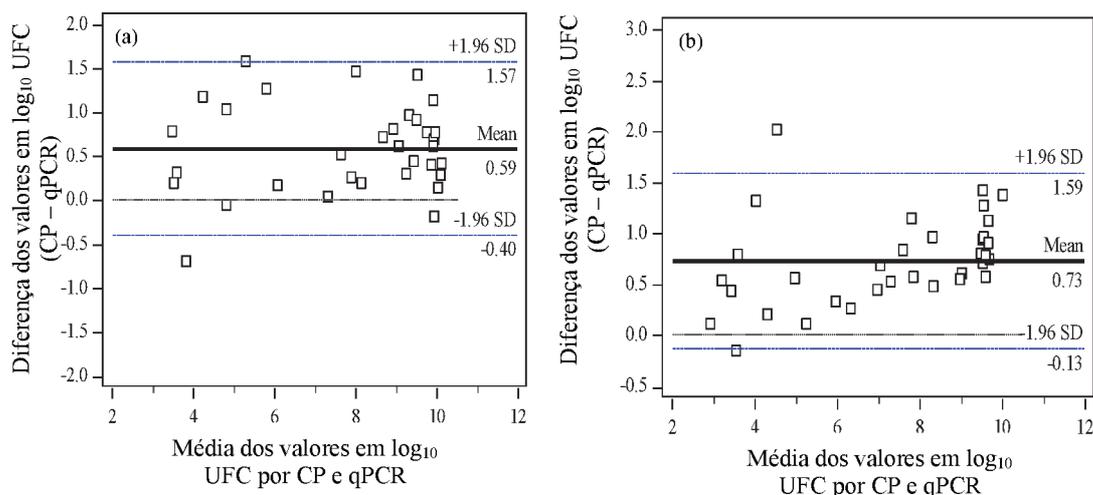
Achilleos e Berthier (2017) estudaram a quantificação de cepas iniciadores na fabricação de queijos durante as fases de crescimento. Nas fases exponencial e estacionária, observaram que os dados obtidos por qPCR foram menores àqueles obtidos por CP. Esses autores consideraram a subestimação devido às diferenças biológicas entre as células, porque esses dois métodos são baseados em princípios totalmente diferentes. No entanto, nenhuma regra prática foi relatada na literatura para explicar a concordância entre os métodos de qPCR e de CP.

Figura 8.3 - Análise de regressão linear dos valores de \log_{10} UFC/g obtidos por CP e TaqManTM qPCR para todas as temperaturas estudadas. (a) Correlação entre CP e TaqManTM qPCR para quantificação de *Weissella viridescens* (WV) em amostras de MB artificialmente contaminadas. (b) Correlação entre CP e TaqManTM qPCR para quantificação de *Leuconostoc mesenteroides* (LM) em amostras de MB artificialmente contaminadas. Linhas tracejadas em todos os dois gráficos representam o intervalo de confiança e a equação linear da linha de tendência é representada pela linha contínua em negrito. R^2 , coeficientes de determinação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 8.4 - Avaliação da concordância entre os métodos CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de *Weissella viridescens* (*WV*) e *Leuconostoc mesenteroides* (*LM*), em amostras de MB artificialmente contaminadas para todas as temperaturas estudadas, usando análise de Bland-Altman. (a) Concordância entre CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de *WV*. Média de 0,59 ($\pm 1,96$ DP de -0,40 a 1,57 \log_{10}). (b) Concordância entre CP e TaqMan™ qPCR para quantificação de *LM*. Média de 0,73 ($\pm 1,96$ DP de -0,13 a 1,59 \log_{10}). A linha pontilhada fina representa a diferença zero, enquanto os desvios-padrão da diferença média de \log_{10} são representadas como linhas pontilhadas espaçadas e finas. DP, desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

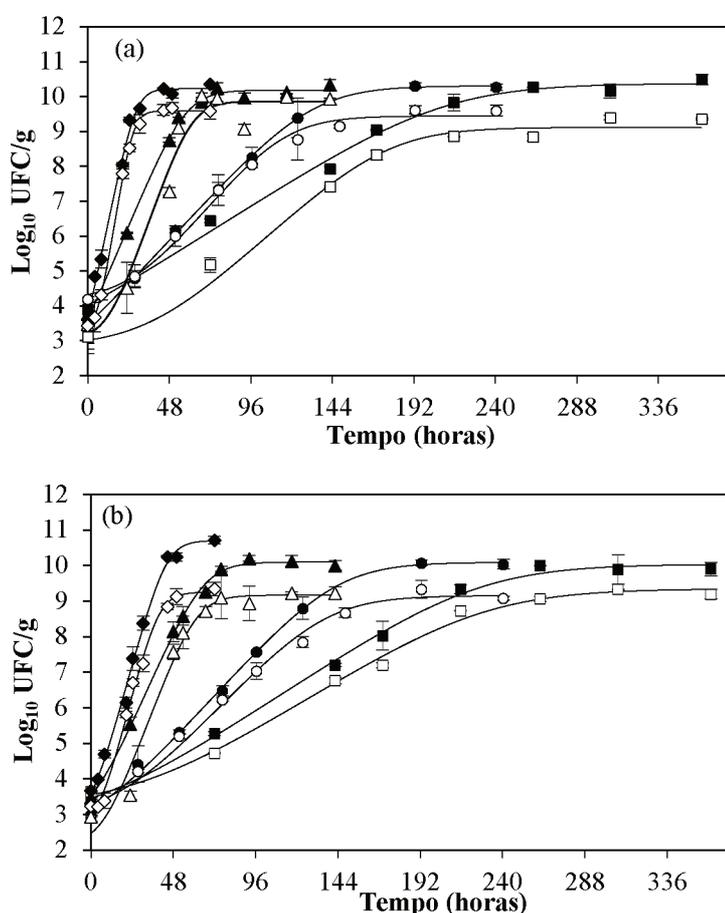
8.2.3 Modelagem primária de *LM* e *WV* em MB por CP e por TaqMan™ qPCR

Nesse estudo, foram obtidas as curvas de crescimento de um coquetel de cinco linhagens de *LM* e de cinco linhagens de *WV* em MB a 5, 8, 13 e 18 °C. As curvas de crescimento das cinco cepas de *LM* e das cinco cepas de *WV* em MB armazenada em diferentes condições isotérmicas foram quantificadas pelos métodos de CP e de TaqMan™ qPCR, representadas na Figura 8.5.

O modelo de BAR foi ajustado aos dados experimentais do crescimento de *LM* e *WV* em MB a 5, 8, 13 e 18 °C, derivados dos métodos de CP e de TaqMan™ qPCR. Os parâmetros do modelo foram estimados na modelagem em duas etapas (MDE). Na primeira etapa, foi calculado o valor médio (\pm DP) para o parâmetro h_0 , resultando em $h_0 = 0,66 (\pm 0,37)$ (método CP) e $h_0 = 1,91 (\pm 1,24)$ (método TaqMan™ qPCR) para *LM* e $h_0 = 0,14 (\pm 0,15)$ (método CP) e $h_0 = 1,81 (\pm 1,72)$ (método TaqMan™ qPCR) para *WV*. Na segunda etapa, o modelo BAR (com valor fixo do parâmetro h_0 previamente obtido) foi ajustado novamente aos dados experimentais do crescimento de *LM* e *WV* em MB, e os parâmetros do modelo (y_0 , λ , μ_{\max} e

$y_{m\acute{a}x}$) foram estimados, tal como proposto por Baranyi et al. (1995) e aplicado por Longhi et al. (2014) e Menezes et al. (2018). No modelo de BAR, λ está relacionado ao parâmetro h_0 (Equação 7.5 da Seção 7). Para *LM* e *WV*, todos os dados de crescimento apresentaram tendências crescentes demonstrando curvas de crescimento sigmoide, com as fases de latência, exponencial e estacionária (Figura 8.5), para ambas as bactérias.

Figura 8.5 - Dados de crescimento de (a) *Weissella viridescens* (*WV*) e (b) *Leuconostoc mesenteroides* (*LM*) a 5 °C (■ ou □), 8 °C (● ou ○), 13 °C (▲ ou △) e 18 °C (◆ ou ◇) quantificados por métodos de CP (símbolos preenchidos) e TaqMan™ qPCR (símbolos vazados), e o ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (BAR, linhas contínuas) aos dados experimentais obtidos em MB. As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

As contagens iniciais das amostras inoculadas foram entre 3,11 e 4,18 log_{10} UFC/g e entre 2,90 e 3,67 log_{10} UFC/g para *LM* e *WV*, respectivamente, considerando-se todos os dados de crescimento enumerados pelos dois métodos. Como presumido, a temperatura teve um forte impacto no comportamento bacteriano. Nesse estudo, a temperatura na incubadora não variou

mais que $\pm 0,3$ °C. A fase estacionária foi alcançada após aproximadamente 3, 7, 15 e 20 dias a 18, 13, 8 e 5 °C, respectivamente, e a concentração bacteriana máxima em todos os casos foi superior a $9 \log_{10}$ UFC/g, independente das condições de armazenamento (Figura 8.5).

A velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{m\acute{a}x}$ (1/h) aumentou com a elevação da temperatura e variou entre 0,031 1/h (5 °C) e 0,191 1/h (18 °C) para *LM* e entre 0,031 1/h (5 °C) e 0,305 1/h (18 °C) para *WV*, e o tempo de latência λ diminuiu de 62 h a 5 °C a 3,74 h a 18 °C para *LM* e de 39,88 h a 5 °C a 0,6 h a 18 °C para *WV* (Tabela 8.4). Os valores $\mu_{m\acute{a}x}$ e λ foram similares, considerando o desvio-padrão, aos publicados para *WV* em caldo de cultivo na faixa de temperatura de 4 °C a 30 °C (MARTINS et al., 2016), e para *LM* em meio de cultura sob condições anaeróbias na faixa de temperatura de 10,5 °C a 17,5 °C, que foram listados por Zurera-Cosano et al. (2006). Esses resultados demonstraram que a MB foi um nutriente rico para o crescimento de BAL e, reforçando assim, que os produtos cárneos devem ser armazenados a temperaturas de refrigeração para aumentar os valores de λ e evitar que essas bactérias alcancem maiores valores de $\mu_{m\acute{a}x}$.

As amostras de MB inoculadas artificialmente com *LM* e com *WV*, alcançaram a vida útil em 6,4 e 5,4 dias, respectivamente, ambas a 5 °C de armazenamento determinadas por qPCR (Tabela 8.4). Nesse período, sinais evidentes de deterioração do produto tornaram-se observáveis em todas as amostras, como descoloração, perda de vácuo e odor ácido. Segundo Kalschne et al. (2015), essas são as mudanças mais importantes provocadas por BAL, as quais afetam a decisão de compra do consumidor, posto que atingem, negativamente, a aparência do produto. Ademais, ao se considerar uma variação de temperatura de 5 °C a 8 °C, a vida útil do produto foi reduzida de 5,4 para 3,1 dias (Tabela 8.4). Logo, torna-se importante manter a cadeia do frio da carne e dos produtos cárneos, pois os abusos de temperatura resultam em variações na qualidade do produto durante a distribuição e no final da vida útil, e podem causar deterioração antes do consumo, o que aumenta o desperdício de alimentos e as perdas econômicas (BRUCKNER et al., 2012; MACK et al., 2014).

No estudo relatado por Diez et al. (2009a), a vida útil de MB foi de 4 dias quando inoculadas artificialmente com *LM* e *WV* sob 4 °C de armazenamento, devido às contagens iniciais ($6 \log_{10}$ UFC/g) utilizadas. Segundo Santos et al. (2005a), a vida útil de MB depende dos níveis iniciais de contaminação e das condições de armazenamento. Deve-se ressaltar que, o MB fatiado, usado nesse estudo, é mais suscetível à deterioração quando comparado ao produto inteiro devido à uma maior quantidade da superfície exposta do produto.

Tabela 8.4 - Parâmetros de crescimento (\pm 95% IC) estimados pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (BAR) (segunda etapa, fixo h_0) aos dados experimentais de *W. viridescens* (WV) e *L. mesenteroides* (LM) em MB artificialmente inoculada a 5, 8, 13 e 18 °C obtidos pelos métodos de TaqMan™ qPCR e de CP.

Método	T (°C)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (1/h)	λ (h)	$\gamma_{m\acute{a}x}$ (log ₁₀ UFC/g)	Vida útil (dias)
		<i>Weissella viridescens</i> (WV)			
CP	5	0,031 (\pm 0,005)	4,55 (\pm 0,59)	10,38 (\pm 0,37)	4,2
	8	0,053 (\pm 0,002)	2,69 (\pm 0,09)	10,31 (\pm 0,11)	2,9
	13	0,117 (\pm 0,014)	1,22 (\pm 0,13)	10,19 (\pm 0,25)	1,3
	18	0,236 (\pm 0,029)	0,60 (\pm 0,07)	10,23 (\pm 0,31)	0,6
TaqMan™ qPCR	5	0,045 (\pm 0,008)	39,88 (\pm 7,92)	9,12 (\pm 0,42)	5,4
	8	0,061 (\pm 0,007)	29,63 (\pm 3,66)	9,45 (\pm 0,29)	3,1
	13	0,140 (\pm 0,035)	12,92 (\pm 4,26)	9,87 (\pm 0,68)	1,7
	18	0,305 (\pm 0,012)	5,94 (\pm 3,01)	9,59 (\pm 0,12)	0,8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (LM)					
CP	5	0,032 (\pm 0,003)	20,54 (\pm 1,73)	10,04 (\pm 0,28)	5,5
	8	0,053 (\pm 0,004)	12,44 (\pm 0,91)	10,10 (\pm 0,28)	3,5
	13	0,111 (\pm 0,008)	5,99 (\pm 0,40)	10,10 (\pm 0,18)	1,6
	18	0,177 (\pm 0,019)	3,74 (\pm 0,36)	10,71 (\pm 0,45)	1,0
TaqMan™ qPCR	5	0,031 (\pm 0,003)	62,01 (\pm 7,66)	9,35 (\pm 0,33)	6,4
	8	0,052 (\pm 0,008)	36,67 (\pm 6,16)	9,16 (\pm 0,46)	4,0
	13	0,130 (\pm 0,027)	14,76 (\pm 3,83)	9,17 (\pm 0,53)	1,9
	18	0,191 (\pm 0,021)	10,04 (\pm 1,26)	9,26 (\pm 0,40)	1,2

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

8.2.4 Avaliação do modelo primário de BAR ajustado aos dados de *LM* e *WV* em MB

Os valores dos índices estatísticos (R^2_{aj} , RMSE, F_E e F_B), obtidos pelo ajuste do modelo BAR aos dados experimentais alcançados pelos métodos TaqMan™ qPCR e CP para cada temperatura, são representados na Tabela 8.5. Os valores médios de R^2_{aj} (\pm DP) para *LM* e *WV* foram 0,990 (\pm 0,009) e 0,988 (\pm 0,015), respectivamente, e os valores de RMSE para *LM* e *WV* foram menos ou iguais a 0,423 e a 0,553 \log_{10} UFC/g, respectivamente, para os dois métodos. Menezes et al. (2018) estudaram o crescimento de BAL em presunto fatiado e embalado a vácuo com e sem óleo essencial de orégano a diferentes temperaturas, reportando valores médios de R^2 entre 0,941 (\pm 0,035) e 0,979 (\pm 0,014) para o modelo BAR. Slongo et al. (2009) obtiveram um valor médio de R^2 de 0,80 ao avaliarem o crescimento de BAL em presuntos pressurizados. Feng, Drummond e Sun (2014) encontraram valores de RMSE de 0,3 a 0,4 \log_{10} UFC/g para o crescimento de BAL em salsichas irlandesas cozidas a vácuo e resfriadas. Assim, os valores de R^2_{aj} e RMSE encontrados nesse trabalho são excelentes e provaram que o modelo BAR obteve um bom ajuste aos dados observados.

O desempenho do modelo obtido para os métodos TaqMan™ qPCR e CP também foi avaliado baseando-se nos fatores F_T e F_E . Como representado na Tabela 8.5, os valores desses fatores estavam próximos de 1,0, dentro da faixa aceitável e, portanto, todos atenderam aos requisitos definidos por Ross (1996). Para as amostras de MB inoculadas com *LM*, os valores médios de F_E foram 1,016 (\pm 0,004) e 1,037 (\pm 0,016) para os métodos CP e TaqMan™ qPCR, respectivamente, enquanto que, para *WV* os valores médios de F_E foram 1,017 (\pm 0,008) e 1,030 (\pm 0,019) para os métodos CP e TaqMan™ qPCR, respectivamente. Na Tabela 8.5, todos os valores médios de F_T de ambas as espécies foram iguais a 1,000 (\pm 0,002) para os métodos CP e TaqMan™ qPCR. Esses resultados indicaram que as predições do modelo BAR não diferem das observações do crescimento de *LM* e *WV* pelos métodos CP e TaqMan™ qPCR. Os dados demonstram, ainda, que as curvas preditas podem descrever, com precisão, o crescimento dessas bactérias em MB sob temperaturas isotérmicas de armazenamento. Zurera-Cosano et al. (2005) obtiveram valores de $F_T = 1,00$ e $F_E = 1,13$ para validação do modelo de rede neural artificial de *LM* em produtos cárneos cozidos, fatiados e embalados a vácuo.

Tabela 8.5 - Índices estatísticos obtidos pelo ajuste do modelo de Baranyi e Roberts (BAR) aos dados experimentais de *Weissella viridescens* (*WV*) e *Leuconostoc mesenteroides* (*LM*) em MB artificialmente inoculadas a 5, 8, 13 e 18 °C obtidos pelos métodos de CP e de TaqMan™ qPCR.

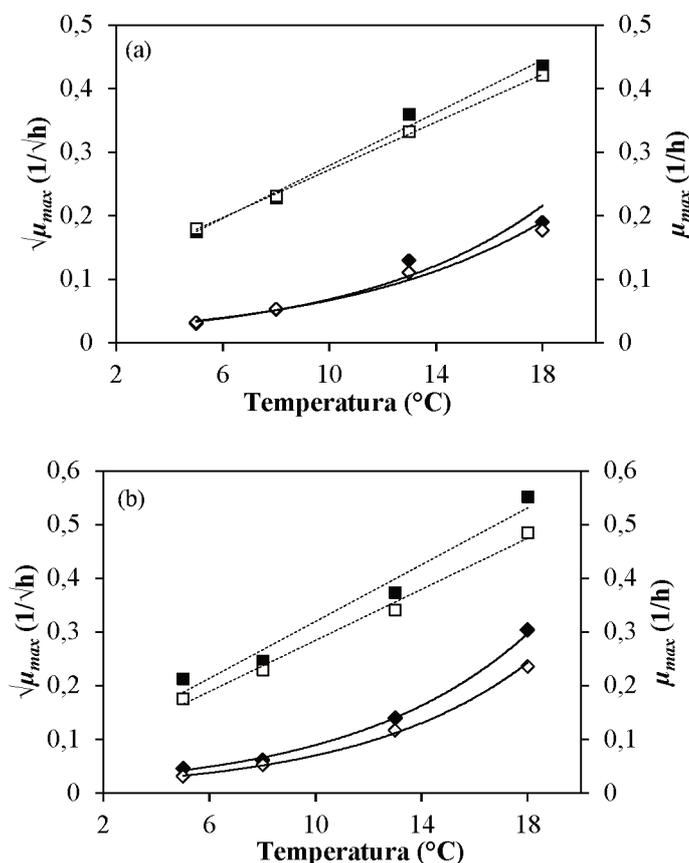
Espécie	Método	T (°C)	R^2_{aj}	RMSE (\log_{10} UFC/g)	F_E	F_B
<i>W. viridescens</i>	CP	5	0,990	0,228	1,021	1,001
		8	1,000	0,058	1,005	1,000
		13	0,993	0,198	1,016	1,000
		18	0,993	0,225	1,024	1,000
	TaqMan™ qPCR	5	0,984	0,305	1,036	1,003
		8	0,991	0,198	1,020	1,001
		13	0,952	0,553	1,053	0,999
		18	0,999	0,092	1,010	1,000
<i>L. mesenteroides</i>	CP	5	0,996	0,160	1,014	1,000
		8	0,997	0,147	1,018	1,001
		13	0,997	0,136	1,011	1,001
		18	0,994	0,225	1,021	1,000
	TaqMan™ qPCR	5	0,993	0,184	1,017	1,000
		8	0,986	0,273	1,038	1,004
		13	0,971	0,423	1,057	0,999
		18	0,992	0,233	1,034	1,001

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

8.2.5 Modelagem secundária de *LM* e *WV* em MB por CP e por TaqMan™ qPCR

A influência da temperatura de armazenamento sobre a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de *LM* e de *WV* em MB foi estabelecida por intermédio de modelos secundários. Os valores dos parâmetros estimados (\pm 95% de intervalo de confiança) de a , b , c e T_{min} do ajuste dos modelos secundários Exponencial (Equação 7.6) e Raiz quadrada de Ratkowsky (Equação 7.7) para os valores do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ e os índices estatísticos (R^2_{aj} e RMSE) são representados na Tabela 8.6, e o ajuste dos modelos secundários para $\mu_{m\acute{a}x}$ são representados na Figura 8.6. Os resultados indicaram que, quando a MB foi inoculada com o coquetel de *LM* e *WV* e armazenada a temperaturas constantes de 5 a 18 °C, ambas as espécies cresceram conforme o esperado, apresentando um aumento da velocidade de crescimento com a elevação da temperatura.

Figura 8.6 - Ajuste dos modelos secundários aos dados do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ de (a) *Leuconostoc mesenteroides* (LM) e (b) *Weissella viridescens* (WV) em MB obtidos pelos métodos TaqMan™ qPCR (símbolos preenchidos) e CP (símbolos vazados). Em ambos os gráficos, a linha tracejada representa o ajuste do modelo secundário da raiz quadrada de Ratkowsky (■ ou □) e as linhas contínuas representam o ajuste do modelo secundário exponencial (◆ ou ◇).



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O modelo secundário de raiz quadrada de Ratkowsky representou bem a dependência do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ de LM com a temperatura para o modelo BAR, com valores R^2_{aj} acima de 0,985 e valores de RMSE $\leq 0,015$ para os métodos TaqMan™ qPCR e CP. O ajuste do modelo Exponencial melhor representou a dependência do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ de WV com a temperatura, com R^2_{aj} igual a 0,996 e RMSE de 0,007 para os dois métodos, conforme representado na Tabela 8.6.

Finalmente, o método de TaqMan™ qPCR foi útil para construir o modelo preditivo porque essa técnica, baseada em DNA, mostrou alta precisão de quantificação para coletar dados de crescimento de bactérias alvo e estimar a cinética de crescimento de LM e WV em produto cárneo cozido e embalado a vácuo, sob condições isotérmicas. Dessa forma, pesquisadores da área de modelagem preditiva serão confrontados com novos desafios

experimentais, e informações fisiológicas e moleculares estarão cada vez mais disponíveis para incorporação em modelos preditivos (McMEEKIN et al., 2008).

Tabela 8.6 - Valores dos parâmetros estimados (\pm intervalo de confiança) (a , b , c e T_{min}) do ajuste dos modelos secundários Exponencial e Raiz quadrada de Ratkowsky para os valores do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ e os índices estatísticos (R^2_{aj} e RMSE).

Espécie	Método	Modelos secundários							
		Exponencial				Raiz quadrada de Ratkowsky			
		a (1/h)	b (1/°C)	R^2_{aj}	RMSE	c (1/ (°C \sqrt{h}))	T_{min} (°C)	R^2_{aj}	RMSE
<i>WV</i>	CP	0,016 (\pm 0,009)	0,151 (\pm 0,032)	0,996	0,007	0,024 (\pm 0,008)	-1,98 (\pm 4,82)	0,981	0,019
	TaqMan™ qPCR	0,020 (\pm 0,010)	0,151 (\pm 0,031)	0,996	0,007	0,026 (\pm 0,014)	-2,11 (\pm 7,27)	0,958	0,031
<i>LM</i>	CP	0,020 (\pm 0,018)	0,123 (\pm 0,056)	0,979	0,010	0,019 (\pm 0,002)	- 4,53 (\pm 1,41)	0,999	0,004
	TaqMan™ qPCR	0,023 (\pm 0,037)	0,120 (\pm 0,100)	0,932	0,019	0,021 (\pm 0,006)	- 3,60 (\pm 4,72)	0,985	0,015

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

8.3 CONCLUSÕES

Sob condições isotérmicas (5 a 18 °C), este estudo comparou e combinou os métodos de TaqMan™ qPCR e de CP a modelos preditivos para descrever o crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em *morcilla* embalada a vácuo. Os resultados do método de qPCR foram semelhantes àqueles do método microbiológico convencional de CP e ambos foram adequados para avaliar as curvas de crescimento.

O modelo de Baranyi e Roberts pode ser aplicado para o ajuste de dados moleculares e os modelos secundários Exponencial e da Raiz Quadrada de Ratkowsky representaram bem a dependência da velocidade máxima específica de crescimento de *W. viridescens* e de *L. mesenteroides*, respectivamente, com a temperatura.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estabelecimento e validação de modelos preditivos é de grande interesse para as indústrias de produtos cárneos, pois esses modelos podem auxiliar na compreensão de protocolos de detecção quantitativa, com diferenciação da microbiota, visando melhorar a predição da vida útil de alimentos, aprimorando assim, a prevenção da deterioração e garantindo a qualidade dos produtos. Nesta tese, os modelos primários e secundários foram utilizados para o estabelecimento e validação de modelos preditivos convencionais (método de contagem em placas) e moleculares (método da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa) em meio de cultivo e em *morcilla* de Burgos embalada e armazenada a vácuo. Os modelos preditivos podem ser utilizados para a predição em outros produtos cárneos sem inoculação (microbiota natural) e em condições não-isotérmicas, representativas de boas ou más práticas de armazenamento. A partir dos resultados discutidos e das conclusões apresentadas no final de cada seção, podem ser destacadas as seguintes conclusões:

- O protocolo de SYBR[®] Green qPCR desenvolvido na Seção 5 pode ser considerado uma ferramenta confiável, rápida, simples e precisa para a detecção e quantificação específica de *W. viridescens* a 30 °C de cultivo.
- As curvas-padrão construídas a partir de um coquetel de cepas de *W. viridescens* foram específicas e apresentam valores de eficiência adequados, permitindo a obtenção de dados experimentais de crescimento dessa espécie em cultura pura e em cultura mista com *L. mesenteroides* por SYBR[®] Green qPCR. Esse método demonstrou boa correlação e concordância com o método de CP, com um intervalo de confiança de 95%.
- Os modelos de Baranyi e Roberts, Gompertz modificado e Logístico modificado foram adequados para descrever os dados de crescimento de *W. viridescens* (4 a 30 °C) e do cultivo misto dessa espécie com *L. mesenteroides* a 8 °C, destacando a importância de combinar o método de SYBR[®] Green qPCR com modelagem preditiva, para oferecer uma nova ferramenta de estudo do crescimento de BAL deteriorantes em condições de refrigeração, permitindo o estabelecimento de parâmetros que possam levar a condições que aumentem a vida útil de alimentos deteriorados por essas bactérias.
- O método de TaqMan[™] qPCR combinado com o modelo preditivo forneceu um método eficaz para estimar a cinética de crescimento de *L. mesenteroides* e de *W. viridescens*

sob condições isotérmicas (5 a 18 °C) em produto cárneo cozido e embalado a vácuo, como a *morcilla*. Além disso, uma vantagem do método de qPCR é a sua sensibilidade e especificidade para medir o número de genes alvo em muitas amostras em menor tempo que os métodos convencionais, e ambos os métodos apresentaram uma boa correlação e concordância.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar outras condições de temperatura isotérmicas de refrigeração para avaliar o crescimento em cultura mista, com o objetivo de estabelecer modelos preditivos moleculares baseados no crescimento das espécies dominantes, subdominantes e inibidas das BAL durante a deterioração de produtos cárneos em condições reais de armazenamento.
- Avaliar o impacto do estresse das células na quantificação por contagem em placas e por qPCR.
- Estudar as interações de bactérias deteriorantes e patogênicas com o uso do método de qPCR e modelagem preditiva. Essas interações podem auxiliar na detecção quantitativa, com diferenciação da microbiota deteriorante e patogênica, para prever a vida útil e reduzir o risco de patógenos com maior precisão, garantindo a segurança dos produtos.
- Propor o desenvolvimento de um novo padrão-ouro de quantificação microbiológica para permitir o uso do qPCR como um método complementar para caracterizar a microbiota bacteriana dos produtos, e o seu uso poderia ser considerado como um método de controle de qualidade, para determinar com precisão a vida útil e para o desenvolvimento de novos produtos alimentares e/ou novas estratégias de armazenamento.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, p. 286–295, 2013.

AFSSA. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés. Saisine liée no. 2006-SA-0215, Saisine no. 2007-SA-0174 Afssa, Maison-Alfort, France, 2008.

AHMED, O. B. et al. Detection of *Salmonella* in food samples by culture and polymerase chain reaction methods. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, v. 5, p. 1–3. 2014.

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.

ALTIERI, C. et al. Modelling the survival of starter lactic acid bacteria and *Bifidobacterium bifidum* in single and simultaneous cultures. **Food Microbiology**, v. 25, p. 729-734, 2008.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.

AMÉZQUITA, A. et al. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 123–144, 2005.

ANONYMOUS. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – colony count technique at 30 °C. BS **International Organization for Standardization (ISO) 14214**, BSI, London, UK, 1998.

ANTWI, M. et al. Modelling the combined effect of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono-and coculture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 71-84, 2007.

ARAHAL, D. R. et al. Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker *recN* with in the family “Leuconostocaceae”. **International Microbiology**, v. 11, p. 33–39, 2008.

AUDENAERT, K. et al. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 27, p. 12-18, 2010.

AUDITS INTERNATIONAL. US food temperature evaluation design and summary pages, 1999. Disponível em: http://foodrisk.org/default/assets/File/Audits-FDA_temp_study.pdf.

AXELSSON, L. **Acid lactic bacteria: classification and physiology**. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3 ed. New York: Marcel Dekker Inc, p. 1-66, 2004.

AXELSSON, L.; AHRNÉ, S. Lactic Acid Bacteria. **Applied Microbial Systematics**, p. 367-388, 2000.

AYMERICH, T. et al. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4583–4594, 2003.

AYMERICH, T. et al. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 40-49, 2006.

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

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

BELLARA, S. R. et al. The growth of *Escherichia coli* in a food simulant during conduction cooling: combining engineering and microbiological modelling. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 6085-6095, 2000.

BERDAL, K. G.; HOLST-JENSEN, A. Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. **European Food Research and Technology**, v. 213, p. 432–438, 2001.

BERRUGA, M. I.; VERGARA, H.; LINARES, M. B. Control of microbial growth and rancidity in rabbit carcasses by modified atmosphere packaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1987-1991, 2005.

BJÖRKROTH, J. A.; DICKS, L. M. T. D.; HOLZAPFEL, W. H. Genus III. *Weissella* Collins, Samelis, Metaxopoulos and Wallbanks 1994, 370VP (Effective publication: Collins, Samelis, Metaxopoulos, and Wallbanks 1993, 597), in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edn., v. 3 *The Firmicutes*, eds de Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., et al., editors. (New York, NY: Springer), p. 643–654, 2009.

BJÖRKROTH, J.; HOLZAPFEL, W. “**Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella***,” in *The Prokaryotes*, 3rd Edn. eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, and E. Stackebrandt (New York, NY: Springer Science + Business Media), p. 267–319, 2006.

BJÖRKROTH, K. J. et al. Taxonomic study of *Weissella confuse* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 141-148, 2002.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet** **1**, p. 307–310, 1986.

BONOMO, M. G. et al. Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). **Meat Science**, v. 80, p. 1238-1248, 2008.

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

BORCH, E.; NARBINK, E.; SVENSSON, P. Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 317-330, 1988.

BOVILL, R. A. et al. Baranyi. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 157-165, 2000.

BOVILL, R. A.; BEW, J.; BARANYI, J. Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature: II. Rapidly changing temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 131-137, 2001.

BREEN, A. et al. The refrigerator safari: An educational tool for undergraduate students learning about the microbiological safety of food. **British Food Journal**, v. 108, p. 487–494, 2006.

BRENNAN, M. et al. **Activity recognition and temperature monitoring (ART) feasibility study**. Unit Report 25, Social Science Research Unit, Food Standards Agency, London, UK, 2013.

BROEDERS, S. et al. New SYBRGreen methods targeting promoter sequences used for screening of several GM events pending for authorisation in Europe. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 537-547, 2013.

BROEDERS, S. et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, p. 115-126, 2014.

BRUSA, V. et al. Development and validation of two SYBR green PCR assays and a multiplex real-time PCR for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 10–17, 2015.

BUNCE, C. Correlation, agreement, and Bland-Altman analysis: statistical analysis of method comparison studies. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, p. 4–6, 2009.

- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169–193, 2000.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611–622, 2009.
- CAMARGO, A. P. R. S. **Modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não-isotérmicas de cultivo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil, 2015.
- CAMARGO, A. P. R. S. et al. Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018.
- CAO, J. et al. Assessment of bacterial profiles in aged, home-made Sichuan paocai brine with varying titratable acidity by PacBio SMRT sequencing technology. **Food Control**, v. 78, p. 14-23, 2017.
- CASTILHO, N. et al. *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. **BMC microbiology**, v. 19, p. 63, 2019.
- CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. **Información Tecnológica** [online], v. 18, p. 23-29, 2007.
- CAYRÉ, M.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v. 20, p. 561–566, 2003.
- CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 185-193, 2011.
- CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. Genome diversity in the genera *Fructobacillus*, *Leuconostoc* and *Weissella* determined by physical and genetic mapping. **Microbiology**, v. 156, p. 420–430, 2010.
- CHELO, I. M.; ZÉ-ZÉ, L.; TENREIRO, R. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc–Oenococcus–Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 276–286, 2007.
- CHENOLL, E. et al. Lactic acid bacteria associated with vacuum packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 498-508, 2007.

CHOI, H. J. et al. *Weissella kimchi* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 507-511, 2002.

CLAIS, S. et al. Comparison of viable plate count, turbidity measurement and real-time PCR for quantification of *Porphyromonas gingivalis*. **Applied Microbiology**, v. 60, p. 79-84, 2015.

COCOLIN, L. et al. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 126-129, 2000.

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

COMI, G.; 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 & Technology**, v. 47, p. 114-121, 2012.

CORNU, M. et al. Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. **Food Microbiology**, v. 28, p. 639-647, 2011.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n. 6, p. 1417-1427, 2012

CURK, M. C.; HUBERT, J. C.; BRINGEL, F. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 595-598, 1996.

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 103-114, 1992.

DALCANTON, F. et al. Modelling growth of *Lactobacillus plantarum* and shelf life of vacuum-packaged cooked chopped pork at different temperatures. **International Journal of Food Science Technology**, v. 48, p. 2580-2587, 2013.

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

DE BLACKBURN, C. W. **Food spoilage microorganisms (1st ed.)**. Cambridge England: Woodhead Publishing, 2006.

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, p. 7-12, 2009.

DE BRUYNE, K. et al. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2952–2959, 2007.

DE BRUYNE, K. et al. *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1999–2005, 2010.

DE BRUYNE, K. et al. *Weissella ghanensis* sp. nov., isolated from a Ghanaian cocoa fermentation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2721–2725, 2008.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. R. A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DICKS, L.; DELLAGLIO, F.; COLLINS, M. D. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 45, p. 395–397, 1995.

DIEZ, A. M. et al. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 154–161, 2008a.

DIEZ, A. M. et al. Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of *Morcilla de Burgos*. **Meat Science**, v. 81, p. 171–177, 2009c.

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, p. 168–177, 2009a.

DIEZ, A. M. et al. Spoilage of blood sausages *morcilla de Burgos* treated with high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 246–253, 2008b.

DIEZ, A. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. The influence of different preservation methods on spoilage bacteria populations inoculated in *morcilla de Burgos* during anaerobic cold storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 91–99, 2009b.

DIEZ-GONZALEZ, F. et al. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* based on a time to detect model in culture media and frankfurters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 277-283, 2007.

- DJENANE, D. et al. Effect of lactic acid bacteria on extension of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef stored in CO₂- rich atmosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 405-412, 2005.
- DOULGERAKI, A. I. et al. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1028-1034, 2010.
- DOULGERAKI, A. I. et al. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **Meat Science**, v. 157, p. 130-141, 2012.
- EGAN, A. F.; SHAY, B. J.; ROGERS, P. J. Factors affecting the production of hydrogen-sulfide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum-packaged beef. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, p. 255–262, 1998.
- EHRMANN, M. A.; FREIDING, S.; VOGEL, R. E. *Leuconostoc palmae* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from palm wine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 943–947, 2009.
- 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, p. 62–71, 2008.
- ENDO, A.; OKADA, S. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 58, p. 2195–2205, 2008.
- ERCOLINI, D. et al. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. **Food Microbiology**, v. 27, p. 137-143, 2010.
- ERCOLINI, D. et al. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7372-7381, 2011.
- ERCOLINI, D. High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 3148-3155, 2013.
- ERCOLINI, D.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese bacterial. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3540-3548, 2003.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

EVEN, S. et al. Dynamic response of catabolic pathways to auto acidification in *Lactococcus lactis*: Transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. **Molecular Microbiology**, v. 45, p. 1143–1152, 2002.

FARROW, J. A. E.; FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *leuconostocs* and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 39, p. 279–283, 1989.

FENG, C. H.; DRUMMOND, L.; SUN, D. W. Modelling the growth parameters of lactic acid bacteria and total viable count in vacuum-packaged Irish cooked sausages cooled by different methods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 2659–2667, 2014.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 101-117, 1999.

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

FUCHS, M.; CICHNA-MARKL, M.; HOCHEGGER, R. Development and validation of a duplex real-time PCR method for the simultaneous detection of celery and white mustard in food. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 229-235, 2013.

FUSCO, V. et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Frontiers Microbiology**, v. 6. p. 155, 2015.

GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 405-409, 2009.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. M. **Taxonomic outline of the prokaryotes**. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, release 5.0. New York: Springer, 2004.

GARVIE, E. I. **Genus *Leuconostoc***, p. 1071-1075. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, v. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1986.

GARVIE, E. I. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Knudsen and Sorensen) comb. nov. and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Beijerinck) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 33, p. 11-119, 1983.

GARVIE, E. I. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. **Journal of general microbiology**, v. 48, p. 439–447, 1967.

- GASPARIC, M. B. et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2023-2029, 2010.
- GEITENES, S. et al. Modelagem do crescimento de bactérias lácticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido fatiados e embalados a vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 1, 2013.
- GIFFEL, M. C.; ZWIETERING, M. H. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 135-149, 1999.
- GIGLIO, S.; MONIS, P.; SAINT, C. P. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 31, e. 136, 2003.
- GILBERT, S. E. et al. Survey of internal temperatures of New Zealand domestic refrigerators. **British Food Journal**, v. 109, p. 323-329, 2007.
- GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. Molecular identification and characterization of food-associated lactobacilli. **Italian Journal of Food Science**, v. 12, p. 403-423, 2000.
- GNANOU BESSE, N. et al. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structure media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 43-51, 2006.
- GÓMEZ-ROJO, E. M. et al. 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.
- GONÇALVES, L. D. A. et al. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 352-358, 2017.
- 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, p. 290-297, 2008.
- GRATTEPANCHE, 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, p. 414-421, 2005.
- GU, C. T. et al. *Lactobacillus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 860-863, 2012a.
- GU, C. T. et al. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1548-1551, 2012b.

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

HAAKENSEN, M. C. et al. horA-specific real-time PCR for detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 65, p. 157-165, 2007.

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

HAN, Y. et al. Inactivation of food spoilage bacteria by high pressure processing: evaluation with conventional media and PCR–DGGE analysis. **Food Research International**, v. 43, p. 1719–1724, 2010.

HASSAN, H. F.; DIMASSI, H.; EL, R. Survey and analysis of internal temperatures of Lebanese domestic refrigerators. **International Journal of Refrigeration**, v. 50, p. 165–171, 2014.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (NY)**, 1993.

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, p. 1–20, 2017.

HOLZAPFEL, W. H.; VAN WYK, E. P. *Lactobacillus kandleri* sp. nov., a new species of the subgenus Betabacterium with glycine in the peptidoglycan. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg**, C. 3, p. 495–502, 1982.

HOLZAPFEL, W.; KANDLER, O. Taxonomy of the species *Lactobacillus Beijerinck*. VI. *Lactobacillus coprophilus* subsp. *confusus* nov. subsp., a new variety of the subspecies Betabacterium. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg**, v. 123, p. 657–666, 1969.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365S-373S, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; BJÖRKROTH, J.; DICKS, L. M. T. D.; Genus I. *Leuconostoc* Van Tieghem 1978, 198^{AL} emend. mut. char. Hucker and Pederson, 1930, 66^{AL}, In: P. De. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Trieg, W. Ludwig, F.A., Rainey, K. Scheifer, W.B. Whitman, (Eds.), *Bergeys Manual os Systematic Bacteriology*, v. 3. Springer, New York, USA, v. 13, p. 624–634, 2009.

HU, P. et al. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA DGGE. **Food Control**, v. 20, p. 99-104, 2009.

- HUANG, L. Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. **Food Microbiology**, v. 20, p. 549–559, 2003.
- HUANG, L. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in broth and beef frankfurters - Determination of lag phase duration and exponential growth rate under isothermal conditions. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 235-242, 2008.
- HUANG, L. et al. Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 40-48, 2010.
- HUANG, L. IPMP Global Fit – A one-step direct data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, p. 38–48, 2017.
- IACUMIN, L. et al. A case of spoilage in wurstel sold in an Italian supermarket. **Food Control**, v. 43, p. 245–250, 2014.
- IACUMIN L. et al. Fate of the microbial population and the physico-chemical parameters of "Sanganel" a typical blood sausages of the Friuli, a north-east region of Italy. **Food Microbiology**, v. 63, p. 84-91, 2017.
- ILHA, E. C. et al. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Ann Microbiology**, v. 66, p. 597–606, 2016.
- IRKIN, R. et al. Influence of packaging conditions on some microbial properties of minced beef meat at 4 °C storage. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 17, p. 655-663, 2011.
- JAMES, S. J.; EVANS, J.; JAMES, C. A review of the performance of domestic refrigerators. FRPERC, University of Bristol, Churchill Building, Langford, Bristol. **Journal of Food Engineering**, v. 87, 2008.
- JANG, J. et al. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 29-34, 2012.
- JANSSEN, M. et al. Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 59-72, 2006.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2005.
- JOHNSON, A. E. et al. Food safety knowledge and practice among elderly people living at home. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 52, p. 745–748, 1998.
- JOSEFSEN, M. H. et al. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5097–5104, 2010.

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

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

JUNEJA, V. K.; MARKS, H.; THIPPAREDDI, H. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured beef. **Food Microbiology**, v. 25, p. 42-55, 2008.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v. 25, p. 745-761, 2008.

KANDLER, O.; SCHILLINGER, U.; WEISS, N. *Lactobacillus halotolerans* sp. nov., nom. rev. and *Lactobacillus minor* sp. nov., nom. rev. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 4, p. 280–285, 1983.

KÁNTOR, A. et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from wine using real-time PCR. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, p. 52-56, 2016.

KAWASAKI, S. et al. Characterization and modeling of *Salmonella* growth in pasteurized and nonpasteurized milk using real-time PCR. **Japanese Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 28–35, 2014.

KAWASAKI, S. et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 551–556, 2005.

KEMP, B. M. et al. How Much DNA Is Lost? Measuring DNA Loss of Short-Tandem-Repeat Length Fragments Targeted by the PowerPlex 16® System Using the Qiagen MinElute Purification Kit. **Human Biology**, v. 86, p. 313–329, 2014.

KESMEN, Z. et al. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 428-435, 2012.

KIM, B. et al. *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1123–1126, 2003.

KIM, J.; CHUN, J.; HAN, H. U. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1915–1919, 2000.

- KIM, S. A. et al. Development of a rapid method to quantify *Salmonella* Typhimurium using a combination of MPN with qPCR and a shortened time incubation. **Food Microbiology**, v. 65, p. 7-18, 2017.
- KOORT, J. et al. *Lactobacillus oligofermentans* sp. nov., associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged poultry products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 4400–4406, 2005.
- KOORT, J. et al. Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with “morcilla de Burgos”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 164–168, 2006.
- KORKEALA, H.; BJÖRKROTH, K. J. Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages: a review. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 724-731, 1997.
- KOUTSOUMANIS, K. et al. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. **Applied and Environmental Microbiology** [online], v. 72, n. 1, p. 124-134, 2006.
- KRÄMER, N. et al. A novel strategy to obtain quantitative data for modelling: Combined enrichment and real-time PCR for enumeration of salmonellae from pig carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 86–95, 2011.
- KREYENSCHMIDT, J. et al. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 510–520, 2010.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.
- LAUBE, I. et al. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. **Food Chemistry**, v. 118, n. 4, p. 979-986, 2010.
- LAUPLAND, K. B.; VALIQUETTE, L. The changing culture of the microbiology laboratory. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 24, p. 125–128, 2013.
- LEE, J. S. et al. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1257-1261, 2002.
- LEE, K. W. et al. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. **Anaerobe**, v. 18, p. 96–102, 2012.
- LÉONARD, L. et al. Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* growth: Comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells. **Food Control**, v. 37, p. 200–209, 2014.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.

LI, M. Y. et al. Comparison of Mathematical Models of Lactic Acid Bacteria Growth in Vacuum-Packaged Raw Beef Stored at Different Temperatures. **Journal of Food Science**, v. 78, p. 600–604, 2013.

LIANG, P. S.; PARK, T. S.; YOON, J. Y. Light scattering-based detection of food pathogens. In: **Light Scattering Technology for Food Property, Quality, and Safety Assessment**. Lu R (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, p. 429–444, 2016.

LIU, J. Y. et al. First description of novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 314-320, 2009.

LIU, F.; YANG, R.; LI, Y. Correlations between growth parameters of spoilage microorganisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10 degrees C. **Food Microbiology**, v. 23, p. 578–583, 2006.

LONGHI, D. A. **Avaliação da capacidade preditiva de diferentes modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2012.

LONGHI, D. A. **Delineamento experimental ótimo para a estimativa dos parâmetros do crescimento de *Weissella viridescens* em condições não-isotérmicas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, p.133, 2016.

LONGHI, D. A. et al. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 88-96, 2013.

LONGHI, D. A. et al. Optimal experimental design to model spoilage bacteria growth in vacuum-packaged ham. **Journal of Food Engineering**, v. 216, p. 20–26, 2018.

LONGHI, D. A. et al. Modeling the growth of *Byssoschlamys fulva* on solidified apple juice at different temperatures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 971–978, 2014.

LOPEZ, S. et al. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 289-300, 2004.

LÖRINCZ, F.; INCZE, K. Angaben über die Grünverfärbung von Fleisch und Fleischerzeugnissen hervorruhenden Laktobazillen. **Fleischwirtschaft**, v. 13, p. 406-408, 1961.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. W. How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts?. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 556-562, 2000.

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 Technology**, v. 61, p. 492–5, 2015.

LUEDTKE, B. E.; BOSILEVAC, J.M. Comparison of methods for the enumeration of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from veal hides and carcasses. **Frontiers Microbiology**, v. 6, 2015.

LUNGU, B. et al. Comparison of a real-time PCR method with a culture method for the detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in naturally contaminated environmental samples from integrated poultry houses. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 743–747, 2012.

LYTOU, A.; PANAGOU, E. Z.; NYCHAS, G. J. E. Development of a predictive model for the growth kinetics of aerobic microbial population on pomegranate marinated chicken breast fillets under isothermal and dynamic temperature conditions. **Food Microbiology**, v. 55, p. 25–31, 2016.

MACKAY, I. M. et al. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, I.M. (Ed.), Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. **Caister Academic Press Norfolk, UK**, 2007.

MAGNUSSON, J. et al. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 831–834, 2002.

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

MAMLOUK, K. et al. Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 30, p. 173–179, 2012.

MANICHANH, C. Metagenomic approaches for bacterial detection and identification. In: **Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens**. Liu, D (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, p. 1215–1228, 2011.

MARTÍN, B. et al. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 6040–6048, 2006.

MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; HARLAND, N. M.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of some *leuconostocs* and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small and large-subunit rRNA derived trees. **Journal Applied Bacteriology**, v. 74, p. 532-541, 1993.

MARTÍNEZ-MURCIA, A. J.; COLLINS, M. D. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16s rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 70, p. 73-84, 1990.

MARTINS, W. F. **Predição do crescimento de *Weissella viridescens* sob condições não isotérmicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, p.82, 2015.

MARTINS, W. F. et al. Predicting Growth of *Weissella Viridescens* in Culture Medium under Dynamic Temperature Conditions. **Procedia Food Science**, v. 7, p. 37–40, 2016.

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

MATSUKI, T. et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5445–5451, 2002.

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

McKEE, L.; COBB, E.; PADILLA, S. Quality indicators in poultry products. In: **Handbook of Meat, Poultry, and Seafood Quality**. Nollet, L.M.L.; Boylston, T.; Chen, F.; Coggins, P.C.; Gloria, M.B.; Hyldig, G.; Kerth, C.R.; McKee, L.H.; Hui, Y.H (eds.). Ames, I.A: John Wiley & Sons, Inc., p. 390–409, 2012.

McKELLAR, R. C.; LU, X. Modeling Microbial response in Food. **CRC series in contemporary food science**. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2004.

McMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Shelf life prediction: status and future possibilities. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, NL, v. 33, p. 65-83, 1996.

McMEEKIN, T. A. et al. The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 2–9, 2008.

McMEEKIN, T. A.; ROSS, T.; OLLEY, J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 13–32, 1992.

McMEEKIN, T. A. et al. Quantitative microbiology: A basis for food safety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 541–549, 1997.

McPHERSON, M. J.; MØLLER, S. G. PCR (the basics). 2nd ed. Taylor & Francis; New York, NY: 2006.

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.

MENEZES, N. M. C. **Efeito da adição de óleo essencial de orégano sobre a vida útil de presunto fatiado embalado a vácuo: modelagem em condições isotérmicas e não isotérmicas**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 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, p. 113-119, 2018.

MEZAROBA, M. E. P. C. **Avaliação da Vida Útil de Filés de Frango Resfriados, Embalados a Vácuo e em Atmosfera Modificada sob Armazenamento Isotérmico e não Isotérmico**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2014.

MILBOURNE, K. Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. **Meat Science**, v. 9, p. 113-119, 1983.

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.

MOHANIA, D. et al. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v. 9, p. 190-198, 2008.

MOKHTARI, W. et al. Real-time PCR using SYBR Green for the detection of *Shigella* spp. in food and stool samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, n. 1, p. 53-59, 2013.

MURPHY, P. M.; REA, M. C.; HARRINGTON, D. Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 557-564, 1996.

NANODROP TECHNOLOGIES. INC. **ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual**. Wilmington, USA, p. 61, 2007.

NES, I. F.; JOHNSBORD, O. Exploration of antimicrobial potencial in LAB by genomics. **Current Opinium Biotechmology**, v. 15, p. 100-104, 2004.

NICKLAS, J. A.; BUEL, E. Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. **Journal of Forensic Sciences**, v. 48, p. 936-44, 2003.

NIVEN, C. F.; EVANS, J. B. *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. **Journal of Bacteriology**, v. 73, p. 758–759, 1957.

NOCKER, A.; CHEUNG, C. Y.; CAMPER, A. Y. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 310-320, 2006.

NOGVA, H. K. et al. Application of 50-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4266-4271, 2000.

NOVIYANTI, F. et al. Predictive Modeling for the Growth of *Salmonella* Enteritidis in Chicken Juice by Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 7, 2018.

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

OH, S. J. et al. *Weissella diestrammenae* sp. nov., isolated from the gut of a camel cricket (*Diestrammena coreana*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 2951–2956, 2013.

OLIVEIRA, A. R. R. **Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real**. Dissertação (Mestrado), Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências, Lisboa, p. 131, 2009.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 93-100, 2005.

ORLA-JENSEN, S. (editor). **The Lactic Acid Bacteria**. Høst, Copenhagen, p. 1–196, 1919.

PADONOU, S. W. et al. *Weissella beninensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus *Weissella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, 2010.

PAL, A.; LABUZA, T. P.; DIEZ-GONZALEZ, F. Evaluating the growth of *Listeria monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat frankfurters: influence of strain, temperature, packaging, lactate and diacetate, and background microflora. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1806-1816, 2008.

PAPAMANOLI, E. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, n. 2, p. 859-867, 2003.

PAPÍĆ, B. et al. New Approaches on Quantification of *Campylobacter jejuni* in Poultry Samples: The Use of Digital PCR and Real-time PCR against the ISO Standard Plate Count Method. **Frontiers Microbiology**, v. 8, 2017.

PARENTE, E.; GRIECO, S.; CRUDELE, M. A. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). **Journal Applied Microbiology**, v. 90, p. 943–952, 2001.

- PASSING, W.; BABLOK, H. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures methods for comparison studies on clinical chemistry (Part I). **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 709-720, 1983.
- 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, p. 226-273, 2010.
- PAUDEL, D. et al. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 478-85, 2011.
- PAUL, M. et al. Direct, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in fresh raw whole milk by qPCR. *International Dairy Journal*, v. 41, p. 46-49, 2015.
- PEIRSON, M. D.; GUAN, T. Y.; HOLLEY, R. A. Thermal resistances and lactate and diacetate sensitivities of bacteria causing bologna discoloration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 223–230, 2003.
- PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification. **Springer**, 2008.
- PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F. Development of a real-time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 230–236, 2009.
- PEREIRA, J. A. et al. Effect of packaging technology on microbiological and sensory quality of a cooked blood sausage, Morcela de Arroz, from Monchique region of Portugal. **Meat Science**, v. 101, p. 33–41, 2015.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.
- POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.
- POTHAKOS, V. et al. Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. **Food Microbiology**, v. 39, p. 61-67, 2014.
- 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, p. 34–45, 2016.

- RAHMAN, S. et al. Temperature performance and usage conditions of domestic refrigerator-freezers in Malaysia. **HKIE Transactions**, v. 12, p. 30–5, 2005.
- RATKOWSKY, D. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 1–5, 1982.
- REICHERT-SCHWILLINSKY, F. et al. Stress- and growth rate-related differences between plate count and real-time PCR data during growth of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2132–2138, 2009.
- REYNISSON, E. et al. Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. **Journal Environmental Monitoring**, v. 10, p. 1357–1362, 2008.
- RICCHI, M. et al. Comparison among the Quantification of Bacterial Pathogens by qPCR, dPCR, and Cultural Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-15, 2017.
- RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, p. 160, 1997.
- RODRIGUEZ, M. A. et al. TaqMan real-time PCR for detection and quantitation of pork in meat mixtures. **Meat Science**, v. 70, p. 113–120, 2005.
- 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 Ampli Fluor technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1366-1377, 2004.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Real-time PCR in Food Science: Introduction. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 15, p. 25–38, 2013.
- ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **Journal Applied Bacteriology**, v. 81, p. 501–508, 1996.
- ROSS, T.; DALGAARD, P.; TIENUNGOON, S. Predictive Modelling of the Growth and Survival of *Listeria* in Fishery Products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 231–245, 2000.
- ROSS, T.; DALGAARD, P. Secondary models. R.C. McKellar, X. Lu (Eds.), **Modeling Microbial Responses in Food**, CRC Press, Boca Raton, p. 63–150, 2004.
- ROVIRA, A. et al. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. **Microbiologia**, v. 13, p. 201–208, 1997.
- RUTLEDGE, R. G. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v. 31, e. 93, 2003.

SÁEZ, G. D.; FLOMENBAUM, L.; ZÁRATE, G. Lactic Acid Bacteria from Argentinean Fermented Foods: Isolation and Characterization for their Potential Use as Starters for Fermentation of Vegetables. **Food technology and biotechnology**, v. 56, p. 398–410, 2018.

SAKAMOTO, N. et al. 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 352-359, 2011.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria**. New York: Marcel Dekker, p. 442, 1993.

SAMELIS, J. et al. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 649–660, 1998.

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 degrees C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329-340, 2000a.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 133–143, 2000b.

SANTOS, E. M. et al. Microbiological and sensory changes in “morcilla de Burgos” preserved in air, vacuum and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v. 71, p. 249–255, 2005a.

SANTOS, E. M. et al. Physicochemical and sensory characterization of *Morcilla de Burgos*, a traditional Spanish blood sausage. **Meat Science**, v. 65, p. 893–898, 2003.

SANTOS, E. M. et al. Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 285–296, 2005b.

SCANNELL, A. G. M. et al. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 241-249, 2000.

SCHILLINGER, U. et al. **Lactic acid bacteria**, In: C.D.W. Blackbrun (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, p. 541-578, 2006.

SEVERO, D. S. **Modelagem do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em cultura pura e mista usando PCR quantitativo (qPCR)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2018.

SHAW, B. G.; HARDING, C. D. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, p. 217–223, 1989.

SILVA, C. N. **Estudo da vida útil de linguiça frescal de frango e modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

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

SLONGO, A. et al. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 303-306, 2009.

SNAUWAERT, I. et al. Characterization of strains of *Weissella fabalis* sp. nov. and *Fructobacillus tropaeoli* from spontaneous cocoa bean fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 1709–1716, 2013.

SOMBOON, T. et al. Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 38, p. 121–134, 1992.

SOPER, H. E. et al. On the Distribution of the Correlation Coefficient in Small Samples. Appendix II to the Paper of “Student” and R. A. Fisher. **Biometrika**, v. 11, p. 328-413, 1917.

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

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

TAJABADI, N. et al. *Weissella* sp. *Taj-Apis*, a novel lactic acid bacterium isolated from honey. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 10, p. 263–267, 2012.

TANASUPAWAT, S. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1479-1485, 2000.

TARLAK, F.; OZDEMIR, M.; MELIKOGLU, M. Mathematical modelling of temperature effect on growth kinetics of *Pseudomonas* spp. on sliced mushroom (*Agaricus bisporus*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 274–281, 2018.

TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 348-359, 2004.

THEVENARD, B. et al. Characterization of *Streptococcus thermophilus* two-component systems: In silico analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in

pure or mixed culture with its yogurt partner, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 171-181, 2011.

TOHNO, M. et al. *Weissella oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grains. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 1417–1420, 2013.

TREMARIN, A. et al. Modeling the growth of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* on solidified apple juice by measuring colony diameter and ergosterol content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 23–28, 2015.

UYTTENDAELE, M.; VANWILDEMEERSCH, K.; DEBEVERE, J. Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 386–391, 2003.

VAN IMPE, J. F. et al. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2901-2909, 1992.

VASILOPOULOS, C. et al. Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked gam using culture-dependent and culture-independent approaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1341-1353, 2008.

VELA, A. I. et al. *Weissella ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Mesoplodon bidens*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2758–2762, 2011.

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, p. 33–42, 2005.

VIANA, J. P. G. et al. **Comparação de seis métodos de extração de DNA genômico em Babaçu**. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2, 2012, Belém, Pará. Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012.

VIERSTRAETE, A. **Principle of the PCR**. Department of Biology, Faculty of Science, Ghent University, 1999.

VIHAVAINEM, E. et al. Role of broiler carcasses and processing plant air in contamination of modified-atmosphere-packaged broiler products with psychrotrophic lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1136-1145, 2007.

WALTER, J. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human faeces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2578-2585, 2001.

WANG, F.; NISHINNO, N. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers' grains with or without other feeds as a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2380-2386, 2008.

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

YANG, Z. Q. et al. Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. **Food Microbiology**, v. 26, p. 606-614, 2009.

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, p. 246-254, 2013.

ZANONI, P. et al. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson and Anderson) sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 339-341, 1987.

ŽEL, J. et al. **How to Reliably Test for GMOs**. In: How to Reliably Test for GMOs. Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition. Springer, Boston, MA, 2012.

ZHANG, C. L. et al. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. **Food Control**, v. 18, p. 1149-1158, 2007.

ZHAO, Y. W. et al. Bacteria community analysis by quantitative real-time PCR of fermenting wax gourd and its changes of organic acids. **Journal of Food Processing & Preservation**, v. 38, p. 1653-1659, 2014.

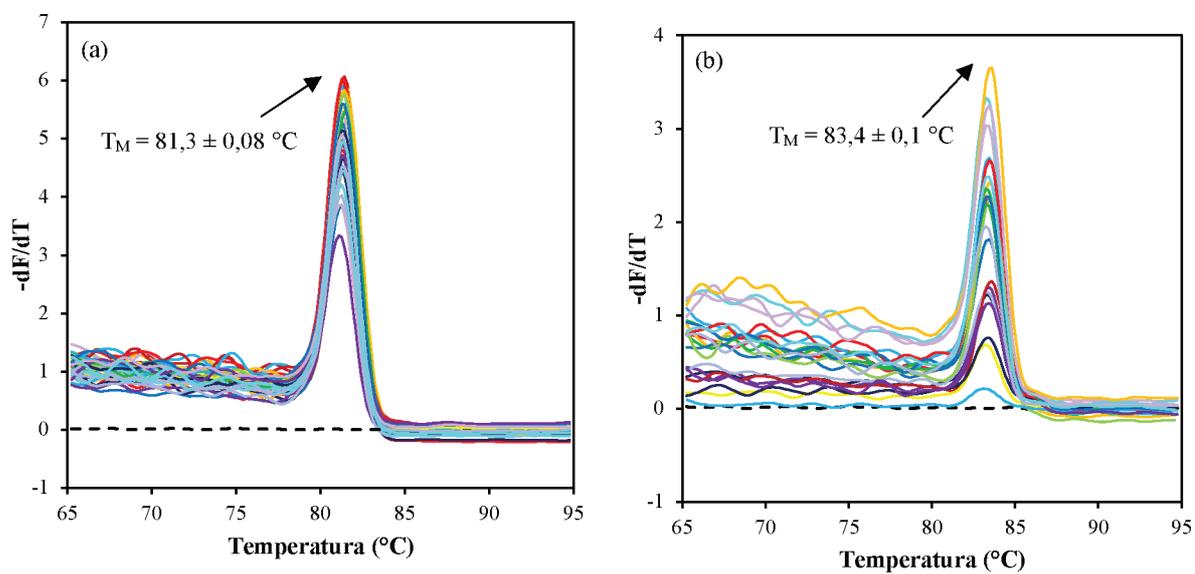
ZURERA-COSANO, G. et al. Validating an artificial neural network model of *Leuconostoc mesenteroides* in vacuum packaged sliced cooked meat products for shelf-life estimation. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 717-724, 2005.

ZURERA-COSANO, G. et al. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. **Food Control**, v. 17, p. 429-438, 2006.

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

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1094-1101, 1991.

APÊNDICE A - Curvas de *melting* para as quantificações do DNA de (a) *W. viridescens* e correspondente e (b) *L. plantarum*. A linha tracejada representa o controle negativo (--) realizados em triplicata.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

APÊNDICE B - Comparação da quantificação de *W. viridescens* e *L. plantarum* por CP e SYBR® Green qPCR.

Tempo de cultivo (horas)	SYBR® Green qPCR				Tempo de cultivo (horas)	SYBR® Green qPCR			
	CP	C_T^b	T_M (°C) ^c	Log_{10} UFC/mL ^d		CP	C_T^b	T_M (°C) ^c	Log_{10} UFC/mL ^d
<i>W. viridescens</i>					<i>L. plantarum</i>				
0	3,68 ± 0,03	25,70 ± 0,50	81,32 ± 0,06	4,70 ± 0,08	0	3,60 ± 0,07	24,62 ± 0,84	83,30 ± 0,07	4,02 ± 0,14
2	3,80 ± 0,01	26,01 ± 0,65	81,22 ± 0,06	4,61 ± 0,10	2	4,13 ± 0,00	21,91 ± 0,01	83,38 ± 0,04	4,93 ± 0,00
4	4,38 ± 0,11	25,71 ± 0,12	81,32 ± 0,06	4,70 ± 0,02	4	4,80 ± 0,07	24,06 ± 0,28	83,25 ± 0,00	4,21 ± 0,05
6	4,87 ± 0,02	23,74 ± 0,75	81,20 ± 0,09	5,33 ± 0,12	6	5,44 ± 0,17	20,06 ± 0,19	83,40 ± 0,00	5,55 ± 0,03
8	5,65 ± 0,05	21,51 ± 0,21	81,32 ± 0,06	6,04 ± 0,03	8	6,01 ± 0,03	18,04 ± 0,53	83,35 ± 0,04	6,22 ± 0,09
10	6,17 ± 0,09	19,02 ± 0,32	81,35 ± 0,00	6,83 ± 0,05	10	6,81 ± 0,11	15,24 ± 0,30	83,38 ± 0,18	7,16 ± 0,05
12	6,91 ± 0,01	16,71 ± 0,24	81,25 ± 0,00	7,57 ± 0,04	12	7,39 ± 0,06	12,59 ± 0,69	83,28 ± 0,00	8,05 ± 0,12
15	7,60 ± 0,00	13,77 ± 0,07	81,38 ± 0,13	8,50 ± 0,01	14	8,23 ± 0,12	9,81 ± 0,28	83,25 ± 0,00	8,98 ± 0,05
18	8,86 ± 0,04	10,37 ± 0,14	81,37 ± 0,03	9,59 ± 0,02	16	9,15 ± 0,35	8,50 ± 0,28	83,50 ± 0,11	9,41 ± 0,05
20	9,18 ± 0,16	10,01 ± 0,03	81,33 ± 0,08	9,70 ± 0,01	18	9,52 ± 0,06	8,49 ± 0,32	83,33 ± 0,11	9,42 ± 0,05
23	9,50 ± 0,00	9,31 ± 0,09	81,38 ± 0,13	9,92 ± 0,01	20	9,59 ± 0,05	8,88 ± 0,64	83,50 ± 0,00	9,29 ± 0,11
27	9,51 ± 0,06	8,72 ± 0,33	81,37 ± 0,03	10,11 ± 0,05	22	9,43 ± 0,07	9,59 ± 0,15	83,50 ± 0,00	9,05 ± 0,02
29	9,62 ± 0,10	8,61 ± 0,11	81,30 ± 0,10	10,15 ± 0,02	24	9,63 ± 0,06	9,20 ± 0,31	83,43 ± 0,11	9,18 ± 0,05

^aMédia ± desvio padrão dos valores de log UFC/mL obtido por contagem em placas em duplicata.

^bMédia ± desvio padrão dos valores de C_T obtidos em triplicata.

^cMédia ± desvio padrão dos valores de T_M obtidos em triplicata.

^dMédia ± desvio padrão dos valores de log_{10} UFC/mL obtido por qPCR em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

APÊNDICE C - Valores do rendimento e qualidade do DNA da cultura mista, valores de C_T e T_M obtidos para cada BAL por SYBR® Green qPCR em reações independentes.

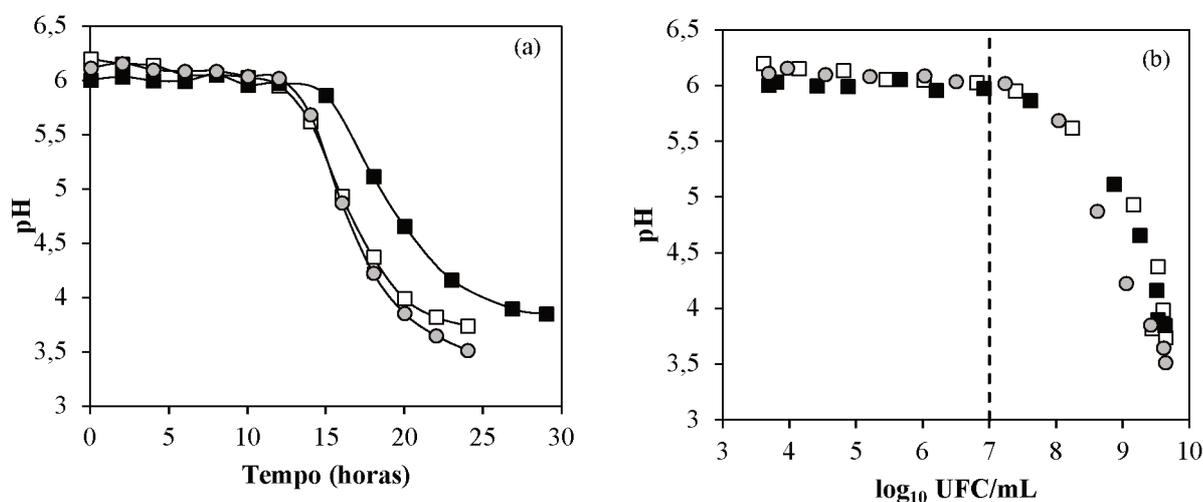
Tempo de cultivo (horas)	Cultura mista		<i>W. viridescens</i>		<i>L. plantarum</i>	
	Rendimento (ng/ μ L)	Qualidade (A_{260}/A_{280})	C_T^a	T_M ($^{\circ}$ C) ^b	C_T^a	T_M ($^{\circ}$ C) ^b
0	8,3	1,66	29,16 \pm 0,13	81,08 \pm 0,08	27,37 \pm 0,10	83,33 \pm 0,08
2	8,6	1,64	29,68 \pm 0,93	81,03 \pm 0,06	27,47 \pm 0,72	83,32 \pm 0,20
4	9,1	1,69	27,13 \pm 0,36	81,03 \pm 0,06	26,40 \pm 0,06	83,32 \pm 0,06
6	6,1	1,67	27,15 \pm 0,06	81,05 \pm 0,18	23,19 \pm 0,15	83,38 \pm 0,03
8	7,6	1,64	21,98 \pm 0,12	81,18 \pm 0,06	19,48 \pm 0,17	83,47 \pm 0,06
10	5,5	1,65	21,96 \pm 0,19	81,07 \pm 0,06	18,60 \pm 0,26	83,38 \pm 0,13
12	6,2	2,30	16,28 \pm 0,01	81,33 \pm 0,14	12,65 \pm 0,20	83,42 \pm 0,18
14	8,7	1,99	16,24 \pm 0,02	81,33 \pm 0,08	12,74 \pm 0,15	83,70 \pm 0,09
16	16,9	1,83	12,21 \pm 0,12	81,25 \pm 0,00	11,32 \pm 0,06	83,50 \pm 0,15
18	23,4	1,89	10,12 \pm 0,34	81,47 \pm 0,06	8,95 \pm 0,08	83,53 \pm 0,12
20	25,9	1,95	9,74 \pm 0,05	81,50 \pm 0,10	8,70 \pm 0,04	83,75 \pm 0,00
22	21,8	1,85	9,39 \pm 0,06	81,50 \pm 0,00	9,04 \pm 0,09	83,63 \pm 0,13
24	26,7	1,83	8,56 \pm 0,03	81,28 \pm 0,06	8,74 \pm 0,05	83,55 \pm 0,09
	Média =	1,81 \pm 0,19				

^aMédia \pm desvio padrão dos valores de C_T obtidos em triplicata.

^bMédia \pm desvio padrão dos valores de T_M obtidos em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

APÊNDICE D - Perfis de pH da cultura pura de *W. viridescens* (■), *L. plantarum* (□) e cultura mista (●) em função do (a) tempo de cultivo e (b) \log_{10} UFC/mL das contagens obtidas por CP. As linhas contínuas representam a ligação entre os pontos experimentais, para facilitar a visualização dos dados. A linha tracejada representa a concentração $7 \log_{10}$ UFC/mL



Os valores médios iniciais de pH de ambos os cultivos puro e misto estavam na faixa de 6,0-6,2. Como podem ser observados no gráfico (a) desse apêndice, os valores de pH foram semelhantes até 12 horas de crescimento para ambos os cultivos puro e misto. Nesse tempo, a contagem de *W. viridescens* atingiu uma concentração aproximada de 10^7 UFC/mL ($7 \log_{10}$ UFC/mL), enquanto o crescimento de *L. plantarum* era 10^8 UFC/mL ($8 \log_{10}$ UFC/mL) (gráfico (b)). No final do cultivo, houve um decréscimo nos valores de pH, ou seja, um aumento da concentração de ácido láctico e a cultura mista apresentou menor valor de pH (pH = 3,51), seguido da cultura pura de *L. plantarum* (pH = 3,74) e de *W. viridescens* (pH = 3,91). Assim, o perfil de pH da cultura mista foi mais próximo da cultura pura de *L. plantarum*.

ANEXO I – Composição dos meios de cultura utilizados na tese.

Meios de cultura utilizados nos experimentos realizados no Brasil

Difco™ *Lactobacilli* MRS broth, pH 6,5 ± 0,2

Meio utilizado para isolamento e cultivo das bactérias ácido-lácticas

Composição: 10,0 g de peptona protease nº 3, 10,0 g de extrato de carne, 5,0 g de extrato de levedura, 20,0 g de dextrose, 1,0 g de polissorbato 80, 2,0 g de citrato de amônio, 5,0 g de acetato de sódio, 0,1 g de sulfato de magnésio, 0,05 g de sulfato de manganês, 2,0 g de fosfato dipotássico, 1000 mL de água destilada. Para o meio sólido, adicionar 15,0 g de ágar (ágar MRS).

Bacto™ *Brain heart infusion* (BHI) broth, 7,4 ± 0,2

Meio utilizado para isolamento e cultivo de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos, incluindo aeróbios e anaeróbio

Composição: 7,7 g de cérebro de bezerros, 9,8 g de infusão de carne e coração, 10,0 g de peptona protease, 2,0 g de dextrose, 5,0 g de cloreto de sódio, 2,5 g de fosfato dissódico e 1000 mL de água destilada.

Meios de cultura utilizados nos experimentos realizados na Espanha

***Lactobacillus* MRS broth, Sigma-Aldrich, Inc., pH 6,5 ± 0,2**

Meio utilizado para isolamento e cultivo das bactérias ácido-lácticas

Composição: 10,0 g de peptona, 8,0 g de extrato de carne, 4,0 g de extrato de levedura, 20,0 g de D (+) - Glicose, 2,0 g de hidrogenofosfato dipotássico, 2,0 g de citrato de tri-amônio, 5,0 g de acetato de sódio tri-hidratado, 0,2 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,05 g de sulfato de manganês tetra-hidratado, 2,0 g de fosfato dipotássico, 1000 mL de água destilada.

***Lactobacillus* MRS agar, Sigma-Aldrich, Inc., pH 6,5 ± 0,2**

Meio utilizado para isolamento e cultivo das bactérias ácido-lácticas

Composição: 10,0 g de peptona universal, 5,0 g de extrato de carne, 5,0 g de extrato de levedura, 20,0 g de D (+) - Glicose, 2,0 g de hidrogenofosfato dipotássico, 2,0 g de citrato de hidrogênio di-amônio, 5,0 g de acetato de sódio, 0,1 g de sulfato de magnésio, 0,05 g de sulfato de manganês, 12,0 g de ágar e 1000 mL de água destilada.

***Ringers solution* 1/4 strength tablets Sigma-Aldrich, Inc. (Solução de Ringer)**

Usada para séries de diluição de leite, produtos lácteos e outras amostras, antes da inoculação em um líquido ou em um meio sólido

Composição: 2,25 g de cloreto de sódio, 0,105 g de cloreto de potássio, 0,12 g de cloreto de cálcio, 0,05 g de bicarbonato de sódio e 1000 mL de água destilada.

ANEXO II – Comprovante de submissão do artigo da Seção 8.

De: eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> en nombre de Luca Cocolin <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Enviado: sábado, 4 de mayo de 2019 21:44

Para: ANA MARIA DIEZ MATE

Asunto: Your Submission

Ms. Ref. No.: FOOD-D-18-00771

Title: Combined use of TaqMan-based quantitative PCR and plate count methods for predicting the growth of lactic acid bacteria in vacuum-packaged cooked meat product
International Journal of Food Microbiology

Dear Dr. Ana Maria Diez,

The reviewers have commented on your above paper. A revision is required.

You are kindly requested to address the comments (included below) and revise your manuscript accordingly. Please make sure to highlight the changes performed in the modified version of the manuscript. You are also asked to check that instructions to authors are fully adhered to.

Please send your revised paper within 60 days. If you are unable to meet this deadline, please contact the editor to request an extension. If the revised paper is not submitted by the deadline it will be treated as a new submission.

When submitting the revised manuscript, please outline each change made (point by point) as raised in the reviewer comments.

To submit your revision, please do the following:

1. Go to: <https://ees.elsevier.com/food/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Needing Revision]