



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

Danielle de Sousa Severo

**Comparação dos métodos PMA-qPCR e contagem em placas para modelagem preditiva
do crescimento de bactérias ácido-láticas, *Salmonella enterica* e suas interações em
presunto de peru defumado**

Florianópolis
2024

Comparação dos métodos PMA-qPCR e contagem em placas para modelagem preditiva do crescimento de bactérias ácido-láticas, *Salmonella enterica* e suas interações em presunto de peru defumado

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof.^a Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dr.^a
Coorientador: Prof. Wiaslan Figueiredo Martins, Dr.

Florianópolis

2024

Danielle de Sousa Severo

Comparação dos métodos PMA-qPCR e contagem em placas para modelagem preditiva do crescimento de bactérias ácido-láticas, *Salmonella enterica* e suas interações em presunto de peru defumado

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 14 de junho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

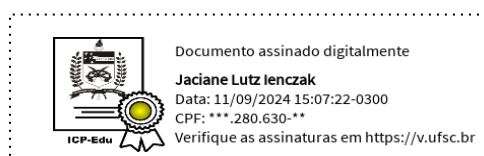
Prof. Daniel Angelo Longhi, Dr.
Universidade Federal do Paraná

Prof.(a) Marília Miotto, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

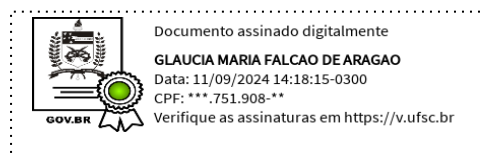
Prof. Jean Carlos Correia Peres Costa, Dr.
Universidad de Lleida, Espanha

Camila Casagrande Paganini, Dr.(a)
Neoprospecta Microbiome Technologies

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos



Prof.(a) Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dr.(a)
Orientadora
Prof. Wiaslan Figueiredo Martins, Dr.
Coorientador

Florianópolis, 2024.

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela bu/ufsc.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Severo, Danielle de Sousa

Comparação dos métodos PMA-qPCR e contagem em placas para modelagem preditiva do crescimento de bactérias ácido lácticas, Salmonella enterica e suas interações em presunto de peru defumado / Danielle de Sousa Severo ; orientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão, coorientador, Wiaslan Figueiredo Martins, 2024.

151 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Salmonella. 3. Weissella viridescens. 4. Leuconostoc mesenteroides. 5. PMA-qPCR. I. Aragão, Gláucia Maria Falcão de . II. Martins, Wiaslan Figueiredo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, José Nilton e Maria Marly, que, apesar de terem apenas o ensino básico, me deram o suporte e incentivo necessários para que sua filha chegasse ao título de Doutora.

AGRADECIMENTOS

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

Autor desconhecido.

Aos meus pais, José Nilton e Maria Marly, e à minha irmã Denise, por possibilitarem todos os meus estudos e apoiarem todas as minhas decisões. Mesmo fisicamente distantes, me deram todo o amor do mundo para me manter firme e forte.

À minha família, que, mesmo de longe, tem me dado apoio e força para essa conquista. Não é fácil estar longe de quem amamos, mas eles se fizeram presentes dentro de mim. Ao amor da minha vida, Neto, que chegou quando eu menos esperava e se tornou a “minha pessoa”. Agradeço por toda a dedicação e empenho em me ajudar sempre. Te amo.

À minha orientadora, Gláucia, pelo apoio, disposição e por todo aprendizado adquirido, tanto como aluna quanto como pessoa. Agradeço pelo acompanhamento, dedicação e todos os estímulos para a produção deste trabalho. Ao meu Chefinho (coorientador), Will, que me acompanha desde a graduação, sendo alguém em quem me espelho. Sem ele, eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por todo o conhecimento que você me transmitiu. Te amo de verdade.

Obrigada aos meus colegas de laboratório Camila, Natielle, Thalles, Fernando e Sandra. É claro que não poderia deixar de agradecer às minhas amigas que são como família para mim aqui em Floripa, especialmente Jaízia e Natália, pelo companheirismo. Agradeço também a Clara por todo companheirismo, por todos os vinhos bebidos, por todos os gatos amados e por estar sempre ao meu lado, muito obrigada, amiga. Agradeço a todos os amigos que conquistei nesses anos.

Aos meus colegas de trabalho da Presto Alimentos por terem me aguentado na fase final desta tese, meu muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Marília Miotto, Prof. Dr. Daniel Angelo Longhi, Prof. Dr. Jean Carlos Correia Peres Costa e Dra. Camila Casagrande Paganini, pela disponibilidade em participar da banca e contribuir com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) – UFSC, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e à FAPESC e ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

Não há louco que não seja lúcido e nem lúcido que não seja louco.

Augusto Cury

RESUMO

Este estudo comparou os métodos *quantitative Polymerase Chain Reaction* com moniazida de propídio (PMA-qPCR) e contagem em placa (CP), combinados com modelagem preditiva, para descrever o crescimento e as interações das bactérias ácido-láticas (BAL), *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella viridescens*, e de três diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* (Heidelberg, Typhimurium e Enteritidis) em presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo (PPF), sob diferentes temperaturas de armazenamento (8, 10, 12, 16 e 20 °C) em monocultivo e co-cultivo. Inicialmente, curvas padrão foram desenvolvidas para os ensaios de PMA-qPCR, demonstrando alta eficiência e sensibilidade, com limites de quantificação entre 1 e 2 log₁₀ UFC/g para todas as espécies, em todas as temperaturas. Essas curvas foram usadas para quantificar a cinética de crescimento das BAL e *S. enterica* pelo método PMA-qPCR, que foi comparado ao método CP. Os resultados mostraram boa correlação entre os métodos para quantificação das três espécies em monocultivo. No entanto, os gráficos de Bland-Altman indicaram que o método CP subestimou o crescimento de *W. viridescens* a 8 °C e de *S. enterica* em todas as temperaturas, sugerindo a presença de células estressadas ou viáveis, mas não cultiváveis (VBNC), detectáveis por PMA-qPCR, mas não por CP. Esse estresse não foi observado para *L. mesenteroides*. Subsequentemente, o modelo de Baranyi e Roberts, assim como os modelos secundários (exponencial e raiz quadrada de Ratkowsky), apresentaram bons índices estatísticos e foram adequados para descrever as curvas de crescimento de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* em PPF obtidas por ambos os métodos em monocultivo. Para estudar a interação entre *S. enterica*, *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em co-cultivo, foram utilizadas duas abordagens distintas. Na primeira, o método CP quantificou o crescimento de *S. enterica* e a contagem total de BAL (CTB), sem diferenciar *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, considerando a CTB como uma única bactéria representada pelos dados de *L. mesenteroides* em monocultivo. Na segunda, o método PMA-qPCR quantificou as três espécies em co-cultivo, utilizando as curvas padrão de monocultivo. O modelo de efeito Jameson modificado, incluindo o fator de interação γ , descreveu adequadamente a interação entre *L. mesenteroides* e *S. enterica*. Observou-se a inibição de *S. enterica* a 8 °C e 10 °C, enquanto a 12 °C, 16 °C e 20 °C, seu crescimento foi interrompido ou significativamente reduzido quando *L. mesenteroides* atingiu sua população máxima. O modelo de interação de três espécies, baseado no efeito Jameson, descreveu bem a interação entre as três bactérias, com RMSE variando de 0,1108 a 0,1948 para *S. enterica*, de 0,0934 a 0,2510 para *W. viridescens*, e de 0,1518 a 0,2823 para *L. mesenteroides*. Em conclusão, os resultados mostraram que o método PMA-qPCR pode descrever a cinética de crescimento microbiano de BAL e *S. enterica* em monocultivo e co-cultivo sob diferentes condições isotérmicas, permitindo quantificar células VBNC e diferenciar espécies morfolologicamente semelhantes. Este estudo contribui para o avanço no uso de métodos moleculares e modelos preditivos na avaliação da vida útil e segurança de produtos cárneos prontos para consumo, como presunto de peru defumado.

Palavras-chave: *Salmonella*; *Weissella viridescens*; *Leuconostoc mesenteroides*; Método molecular; Modelagem preditiva; Segurança dos alimentos.

ABSTRACT

This study compared the quantitative Polymerase Chain Reaction with propidium monoazide (PMA-qPCR) and plate count (PC) methods, combined with predictive modeling, to describe the growth and interactions of lactic acid bacteria (LAB), *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella viridescens*, and three different serotypes of *Salmonella enterica* (Heidelberg, Typhimurium, and Enteritidis) in sliced, vacuum-packaged, smoked turkey ham (STH) under different storage temperatures (8, 10, 12, 16, and 20 °C) in monoculture and co-culture. Initially, standard curves were developed for PMA-qPCR assays, demonstrating high efficiency and sensitivity, with quantification limits between 1 and 2 log₁₀ CFU/g for all species at all temperatures. These curves were used to quantify the growth kinetics of LAB and *S. enterica* by the PMA-qPCR method, which was compared to the PC method. The results showed a good correlation between the methods for the quantification of the three species in monoculture. However, Bland-Altman plots indicated that the PC method underestimated the growth of *W. viridescens* at 8 °C and *S. enterica* at all temperatures, suggesting the presence of stressed or viable but non-culturable (VBNC) cells, detectable by PMA-qPCR but not by PC. This stress was not observed for *L. mesenteroides*. Subsequently, the Baranyi and Roberts model, as well as the secondary models (exponential and Ratkowsky square root), presented good statistical indices and were adequate to describe the growth curves of *L. mesenteroides*, *W. viridescens*, and *S. enterica* in STH obtained by both methods in monoculture. To study the interaction between *S. enterica*, *L. mesenteroides*, and *W. viridescens* in co-culture, two distinct approaches were used. In the first, the PC method quantified the growth of *S. enterica* and the total count of LAB, without differentiating *L. mesenteroides* and *W. viridescens*, considering total count of LAB as a single bacterium represented by the data of *L. mesenteroides* in monoculture. In the second, the PMA-qPCR method quantified the three species in co-culture, using the standard curves of monoculture. The modified Jameson effect model, including the interaction factor γ , adequately described the interaction between *L. mesenteroides* and *S. enterica*. Inhibition of *S. enterica* was observed at 8 °C and 10 °C, while at 12 °C, 16 °C, and 20 °C, its growth was interrupted or significantly reduced when *L. mesenteroides* reached its maximum population. The three-species interaction model, based on the Jameson effect, described the interaction between the three bacteria studied well, with RMSE ranging from 0.1108 to 0.1948 for *S. enterica*, from 0.0934 to 0.2510 for *W. viridescens*, and from 0.1518 to 0.2823 for *L. mesenteroides*. In conclusion, the results showed that the PMA-qPCR method can describe the microbial growth kinetics of LAB and *S. enterica* in monoculture and co-culture under different isothermal conditions, allowing the quantification of VBNC cells and differentiation of morphologically similar species. This study contributes to the advancement in the use of molecular methods and predictive models in the assessment of the shelf life and safety of ready-to-eat meat products, such as smoked turkey ham.

Keywords: *Salmonella*; *Weissella viridescens*; *Leuconostoc mesenteroides*; Molecular method; Predictive modeling; Food safety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Fases de um ciclo de um ensaio de qPCR.. Erro! Indicador não definido.	
Figura 2.2 Esquema das tecnologias SYBR® Green e TaqMan™ durante ensaios de qPCR.....	42
Figura 2.3 Curva padrão genérica obtida por diferentes amostras de concentrações conhecidas de DNA (1, 2, 3, 4 e 5).	43
Figura 2.4 Esquema do princípio do tratamento utilizando o corante PMA para quantificação de células viáveis de bactérias usando qPCR.....	44
Figura 2.5 Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo. ...	46
Figure 3.1 Standard curve constructed by plotting the average Cq values for four PMA-qPCR runs for two independent amplifications against the logarithm of the cell concentration (CFU/g) (determined by PC) of <i>L. mesenteroides</i> in sliced vacuum-packaged smoked turkey	64
Figure 3.2 Standard curve constructed by plotting the average Cq values for four PMA-qPCR runs for two independent amplifications against the logarithm of the cell concentration (CFU/g) (determined by PC) of <i>W. viridescens</i> in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham.	65
Figure 3.3 Linear regression analysis of LAB cells concentration (log ₁₀ CFU/g) obtained by PC against BAL cells concentration (log ₁₀ CFU/g) obtained by PMA-qPCR methods in STH stored at 8 °C (□), 10 °C (○), 12 °C (◇), 16 °C (Δ) and 20 °C (×). Figure (a) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> and Figure (b) <i>Weissella viridescens</i> . Dotted lines represent the 95% confidence interval, and solid lines represent the fit of linear equation (presented with coefficients of determination, R ²).....	66
Figure 3.4 Bland-Altman analysis of agreement of cell concentration values (log ₁₀ CFU/g) obtained by PC and cell concentration obtained by PMA-qPCR methods in STH stored at 8 °C (□), 10 °C (○), 12 °C (◇), 16 °C (Δ) and 20 °C (×). Figure (a) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> and Figure (b) <i>Weissella viridescens</i> . The thin solid line represents the Bias (mean), while the standard deviations from the average difference of log ₁₀ are represented as dashed lines. The solid bold line represents the zero line. SD: standard deviation.....	67
Figura 3.5 Bland-Altman analysis of agreement of cell concentration values (log ₁₀ CFU/g) obtained by PC and cell concentration obtained by PMA-qPCR methods in STH, highlighted to storage at 8 °C. Figure (a) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> and Figure (b) <i>Weissella viridescens</i> The thin solid line represents the Bias (mean), while the standard deviations from	

the average difference of $\log_{10}$ are represented as dashed lines. The solid bold line represents the zero line. SD: standard deviation.....67

Figure 3.6 Growth curves of *Leuconostoc mesenteroides* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at (a) 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C quantified by plate count (PC, filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. The continuous and dashed lines indicate the fitting of Baranyi & Roberts (BAR) model to the experimental data obtained by PC and PMA-qPCR methods, respectively. The error bars show the standard deviation. 69

Figure 3.7 Growth curves of *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at (a) 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C quantified by plate count (PC, filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. The continuous and dashed lines indicate the fitting of Baranyi & Roberts (BAR) model to the experimental data obtained by PC and PMA-qPCR methods, respectively. The error bars show the standard deviation.....70

Figure 3.8 Fitting of secondary models to describe the influence of temperature on μ_{max} parameter data of (a) *Leuconostoc mesenteroides* and (b) *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham obtained by PC (filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. Continuous lines represent the fitting of Ratkowsky square root secondary model (circle symbols data, primary axis), and dashed line represents the fitting of exponential secondary model (symbols lozenge data, secondary axis).....77

Figure 4.1 Standard curve constructed by plotting the average C_q values for four PMA-qPCR runs for two independent amplifications against the cell concentration ($\log_{10}$ CFU/g) (determined by PC) of *Salmonella enterica* cocktail in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast (STB), stored at (a) 8°C, (b) 10°C, (c) 12°C, (d) 16°C, and (e) 20°C. The bold lines represent the linear fit, and the dotted lines represent the 95% confidence interval bands. 94

Figure 4.2 Linear regression analysis of *Salmonella enterica* cells concentration ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PC against *Salmonella enterica* cells concentration ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PMA-qPCR methods in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast stored at 8 °C (□), 10 °C (○), 12 °C (◇), 16 °C (△) and 20 °C (*). Dotted lines represent the 95% confidence interval, and solid lines represent the fit of linear equation (presented with coefficients of determination, R^2).....95

Figure 4.3 Bland-Altman analysis of agreement of *Salmonella enterica* cell concentration values ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PC and *Salmonella enterica* cell concentration obtained by PMA-qPCR methods in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast stored

at 8 °C (□), 10 °C (○), 12 °C (◇), 16 °C (△), and 20 °C (*). The thin solid line represents the Bias (mean), while the standard deviations from the mean difference of $\log_{10}$ are represented as dashed lines. The solid bold line represents the zero line. SD: standard deviation..... 96

Figure 4.4 Growth curves of *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at (a) 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C quantified by plate count (PC, filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. The continuous and dashed lines indicate the fitting of Baranyi & Roberts (BAR) model to the experimental data obtained by PC and PMA-qPCR methods, respectively. The error bars represent the standard deviation of two independent experiments, each with two samples..... 98

Figure 4.5 Fitting of secondary models to describe the influence of temperature on μ_{max} parameter data of (a) *Leuconostoc mesenteroides* and (b) *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham obtained by PC (filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. Continuous lines represent the fitting of Ratkowsky square root secondary model (circle symbols data, primary axis), and dashed line represents the fitting of exponential secondary model (symbols lozenge data, secondary axis)..... 102

Figura 5.1 Visão geral esquemática da obtenção dos parâmetros de interação entre duas bactérias (método de contagem em placa) e três bactérias (método PMA-qPCR) (Baseado em Costa et al. (2019)). 107

Figura 5.2 Ilustração do modo de preparo do coquetel de cultura mista de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica*. 110

Figura 5.3 Fatiador e utensílios utilizados no fatiamento de presunto de peru defumado. 111

Figura 5.4 Fatia de presunto de peru suas respectivas embalagens primária e secundária. (a) Fatia de presunto de peru, (b) embalagem primária, (c) embalagem secundária e (d) presunto de peru fatiado em embalado a vácuo. 112

Figura 5.5 Dados experimentais observados e simulações obtidas pelo modelo preditivo baseado no Efeito Jameson modificado (Cadavez *et al.*, 2019; Cornú *et al.*, 2011; Giménez; Dalgaard, 2004; Møller *et al.*, 2013) para contagem total de bactérias ácido-láticas (CTB) (●) e *S. enterica* (●) em presunto de peru armazenado em condições isotérmicas: (a) 8 °C, (b) 10 °C, (c) 12 °C, (d) 16 °C, (e) 20 °C. Linhas tracejadas vermelha representam as simulações para as cepas de *S. enterica* e linhas sólidas azuis representam as simulações para *L. mesenteroides*. 118

Figura 5.6 Dados experimentais observados e simulações obtidas pelo modelo preditivo de interação de três bactérias (Equações 5.3-5.5) para *L. mesenteroides* (◇),

W. viridescens (♦) e *S. enterica* (♦) em presunto de peru armazenado em condições isotérmicas: (a) 8 °C, (b) 10 °C, (c) 12 °C, (d) 16 °C, (e) 20 °C. Linhas tracejadas vermelha representam as simulações para as cepas de *S. enterica*, linhas tracejadas verdes representam as simulações para as cepas de *W. viridescens* e linhas sólidas azuis representam as simulações para *L. mesenteroides*. 122

LISTA DE TABELAS

Table 3.1 Oligonucleotide primers and probes used in PMA-qPCR amplifications..	57
Table 3.2 Growth parameters ($\pm 95\%$ confidence interval) estimated by fitting of Baranyi and Roberts (BAR) model (second step, fixed h_0) to the experimental data of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> in artificially inoculated sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at 8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.....	72
Table 3.3 Growth parameters ($\pm 95\%$ confidence interval) estimated by fitting of Baranyi and Roberts (BAR) model (second step, fixed h_0) to the experimental data of <i>Weissella viridescens</i> in artificially inoculated sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at 8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.	73
Table 3.4 Estimated parameter values ($\pm$ confidence interval) (a, b, c and T _{min}) of the fitting of Exponential and Ratkowsky square root secondary models to μ_{max} parameter values and the statistical indexes (R^2 and RMSE).....	78
Table 4.1 Growth parameters ($\pm 95\%$ confidence interval) estimated by of Baranyi and Roberts model (second step, fixed h_0) to the experimental data of <i>Salmonella enterica</i> cocktail in artificially inoculated cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast at 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.	100
Table 4.2 Statistical indexes obtained by the fitting of Baranyi and Roberts model to the experimental data of <i>Salmonella enterica</i> cocktail in artificially inoculated cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast at 8, 10, 12, 16 and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.	101
Table 4.3 Estimated parameter values ($\pm$ confidence interval) (a, b, c and T _{min}) of the fitting of Exponential and Ratkowsky square root secondary models to μ_{max} parameter values and the statistical indexes (R^2 and RMSE).....	104
Tabela 5.1 Parâmetros de crescimento estimados pelo modelo secundário da raiz quadrada a partir do método de contagem em placa (log UFC/g) para <i>L. mesenteroides</i> (seções 3.3.4) e <i>S. enterica</i> (seções 4.3.7) em monocultivo, obtidos a partir do modelo de Baranyi e Roberts em peito de peru armazenado a 8, 10, 12, 16 e 20 °C, sem considerar a interação entre os dois microrganismos	115
Tabela 5.2 Parâmetros de crescimento estimados (resultados dos capítulos 3 e 4) a partir do método de PMA-qPCR (log UFC/g) para <i>L. mesenteroides</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>S. enterica</i> em monocultivo, obtidos a partir do modelo de Baranyi e Roberts em peito de peru	

armazenado a 8, 10, 12, 16 e 20 °C, sem considerar a interação entre os três microrganismos.
..... 116

Tabela 5.3 Estimativa do fator de interação (γ) do modelo de efeito Jameson modificado e índice de qualidade do ajuste (RMSE) para *Leuconostoc mesenteroides* e *Salmonella enterica* em co-cultura em presunto de peru fatiado, embalado a vácuo, armazenados em condições isotérmicas. 119

Tabela 5.4 Fatores de competição interespecíficos β_{ij} entre *L. mesenteroides* (LM), *W. viridescens* (WV) e *S. enterica* (SM) em co-cultivo 120

Tabela 5.5 Sinais dos valores de $N1_{max} - \beta_{12}N2_{max}$ e $N2_{max} - \beta_{21}N1_{max}$.. 120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima
adm	adimensional
a_w	Atividade de água
b	Parâmetro empírico
BAL (LAB)	Bactérias Ácido Lácticas (<i>Lactic acid bactéria</i>)
BAR	Modelo de Baranyi e Roberts
BOD	Estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CP (PC)	Contagem em placa (<i>Plate count</i>)
C_T	Ciclo <i>threshold</i>
C_q	Ciclo de quantificação
DO	Densidade óptica
E	Eficiência
EMA	Corante Monoazida de Etídio
F(t)	Função de ajuste
h	Hora
h_0	Parâmetro do modelo de Baranyi e Roberts (estado fisiológico da célula)
IC	Intervalo de confiança
LC	Limite crítico de deterioração para produtos cárnos
LOD	Limite de detecção
Min	Minutos
MRS	Meio de cultivo Man, Rogosa e Sharpe
y	Concentração microbiana
y_0	Concentração microbiana inicial
p	Parâmetro a ser descrito pelos modelos secundários
PMA	Corante Monoazida de Propídio
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
s	Segundos
S	Gênero <i>Salmonella</i>
T	Temperatura (°C)
T_{min}	Temperatura mínima
Ton	Toneladas
UFC	Unidade formadora de colônia
VRBG	Meio de cultivo Ágar Bile Vermelho Violeta Glicose
XLD	Meio de cultivo agar Xilose Lisina Desoxicolato
$y_{m\acute{a}x}$	População máxima atingida
λ	Duração da fase lag

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo geral.....	27
1.1.2	Objetivos específicos.....	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1	CARNE DE PERU E INDUSTRIALIZADOS	30
2.2	A IMPORTÂNCIA DA TEMPERATURA NA CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS	30
2.3	BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL).....	31
2.3.1	Gênero <i>Leuconostoc</i>	32
2.3.1.1	Espécie <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	33
2.3.2	Gênero <i>Weissella</i>	34
2.3.2.1	Espécie <i>Weissella viridescens</i>	34
2.4	<i>SALMONELLA</i> SPP.....	35
2.4.1	<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Heidelberg</i> e <i>S. Typhimurium</i>	36
2.5	INTERAÇÃO MICROBIANA ENTRE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	37
2.6	MÉTODOS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA	39
2.6.1	Contagem em placa (CP)	39
2.7	MÉTODOS MOLECULARES NA MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS.....	40
2.7.1	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....	40
2.7.1.1	PMA-qPCR.....	43
2.8	MODELAGEM PREDITIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO	45
3	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE CONTAGEM DE PLACAS E PMA-QPCR PARA MODELAR O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM PRESUNTO DE PERU DEFUMADO	48
3.1	INTRODUCTION	50
3.2	MATERIALS AND METHODS	52
3.2.1	Microorganisms and inoculum preparation	52
3.2.2	Sample characterization and preparation.....	52

3.2.3	Artificial inoculation of <i>L. mesenteroides</i> and <i>W. viridescens</i> in smoked turkey ham slices and storage conditions	53
3.2.4	Quantification of <i>L. mesenteroides</i> and <i>W. viridescens</i> in STH.....	54
3.2.5	Growth curves by plate count (PC).....	54
3.2.6	Growth curves by PMA-qPCR.....	55
3.2.6.1	Pre-treatment with PMAxx™	55
3.2.6.2	Genomic DNA extraction.....	55
3.2.6.3	PMA-qPCR assay conditions.....	56
3.2.6.4	Standard curves by PMA-qPCR assays.....	58
3.2.6.5	Preparation of growth curves by PMA-qPCR.....	58
3.2.6.6	Comparative analysis between methods.....	59
3.2.7	Growth modeling	59
3.2.7.1	Primary models.....	59
3.2.7.2	Secondary models	60
3.2.7.3	Numerical analysis	60
3.2.7.4	Goodness-of-fit indexes of the primary and secondary models.....	61
3.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	62
3.3.1	Smoked turkey ham characterization.....	62
3.3.2	Standard curves for PMA-qPCR method	62
3.3.3	Comparison of growth data obtained by PMA-qPCR and PC methods.....	66
3.3.4	Primary modeling growth of <i>L. mesenteroides</i> and <i>W. viridescens</i> using PC and PMA-qPCR in STH.....	68
3.3.5	Secondary modeling of <i>L. mesenteroides</i> and <i>W. viridescens</i> using PC and PMA-qPCR in STH	76
3.4	CONCLUSION	79
4	ENSAIO DE QPCR COM PROPÍDIO MONOAZIDA (PMA) COMPARADO AO MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA PARA QUANTIFICAR O CRESCIMENTO DE SOROTIPOS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> EM PEITO DE PERU EMBALADO A VÁCUO, COMBINADO COM UMA ABORDAGEM DE MODELAGEM MATEMÁTICA.....	80
4.1	INTRODUCTION	82
4.2	MATERIALS AND METHODS	84
4.2.1	Turkey breast samples	84
4.2.2	Physical-chemical characterization of turkey breast	84

4.2.3	Microorganisms and inoculum preparation	85
4.2.3.1	<i>Sample preparation for Salmonella enterica cocktail quantification</i>	85
4.2.3.2	<i>Sample packaging.....</i>	86
4.2.4	Storage conditions.....	86
4.2.5	Quantification of <i>Salmonella enterica</i> cocktail in STB.....	87
4.2.5.1	<i>Growth curves by PC method.....</i>	87
4.2.6	Growth curves by PMA-qPCR method.....	87
4.2.6.1	<i>Pre-treatment with PMAxx™.....</i>	87
4.2.6.2	<i>Genomic DNA extraction.....</i>	88
4.2.6.3	<i>PMA-qPCR assay conditions.....</i>	88
4.2.6.4	<i>Generation of standard curves</i>	89
4.2.6.5	<i>Generation of growth curves by PMA-qPCR</i>	89
4.2.7	Comparative analysis between methods.....	89
4.2.8	Growth modeling	90
4.2.9	Primary and secondary models of microbial growth	90
4.2.10	Numerical analysis.....	91
4.2.11	Evaluation of model performance.....	91
4.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	92
4.3.1	<i>Physical-chemical characterization of turkey breast</i>	92
4.3.2	<i>Development of the standard curve for PMA-qPCR assay</i>	92
4.3.3	<i>Comparative analysis of PC and PMA-qPCR methods.....</i>	95
4.3.4	<i>Primary modeling of <i>S. enterica</i> cocktail growth in STB using PC and PMA-qPCR methods.</i>	96
4.3.5	<i>Evaluation of the performance of the primary model for <i>S. enterica</i> cocktail</i>	101
4.3.6	<i>Secondary modeling growth of <i>S. enterica</i> in STB using PC and PMA-qPCR methods</i>	102
4.4	CONCLUSION	104
5	MODELAGEM DA INTERAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E <i>SALMONELLA ENTERICA</i> EM PRESUNTO DE PERU EMBALADO A VÁCUO SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS	106
5.1	<i>INTRODUÇÃO.....</i>	106
5.2	<i>MATERIAL E MÉTODOS.....</i>	107
5.2.1	<i>Modelagem para o estabelecimento de modelos de interação microbiana.....</i>	107
5.2.2	<i>Microorganismos e preparo do inóculo</i>	108

5.2.2.1	Preparo do coquetel de <i>L. mesenteroides</i> e <i>W. viridescens</i>	108
5.2.2.2	Preparo do coquetel de <i>Salmonella enterica</i>	109
5.2.2.3	Preparo do coquetel da cultura mista	109
5.2.2.4	Preparo das amostras.....	110
5.2.2.5	Fatias de presunto de peru defumado inoculado artificialmente.....	111
5.2.2.6	Condições de armazenamento	112
5.2.2.7	Quantificação de <i>L. mesenteroides</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>S. enterica</i> em PPF	112
5.2.2.8	Curvas de crescimento por contagem em placas	113
5.2.2.9	Curvas de crescimento por PMA-qPCR.....	113
5.2.3	Modelagem da interação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> e <i>S. enterica</i> em monocultivo por CP (Abordagem com 2 tipos de bactéria)	114
5.2.4	Modelagem da interação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>S. enterica</i> em co-cultivo por PMA-qPCR (abordagem com 3 bactérias)	115
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
5.3.1	Modelagem do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> e <i>S. enterica</i> em PPF em mono e co-cultivo – (abordagem considerando 2 tipos de microrganismos).....	117
5.3.2	Modelagem da interação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> , <i>W. viridescens</i> e <i>S. enterica</i> em cocultivo por PMA-qPCR (Abordagem considerando 3 microrganismos)	
	120	
5.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	123
6.	CONCLUSÃO GERAL	125
	REFERÊNCIAS.....	127
	APÊNDICE A – RESUMO E CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO PUBLICADO NO 14 SLACA - SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, EM 2021	149
	APÊNDICE B – RESUMO E CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO PUBLICADO NA COFE – CONFERENCE OF FOOD ENGINEERING EM 2022.....	152

DIAGRAMA CONCEITUAL

Comparação dos métodos PMA-qPCR e contagem em placas para modelagem preditiva do crescimento de bactérias ácido-láticas, *Salmonella enterica* e suas interações em presunto de peru defumado

Por quê? Para quê?

- O ritmo acelerado da vida cotidiana contribui para o aumento da procura por alimentos prontos para o consumo, como carnes fatiadas e embaladas a vácuo, como peito de peru e presunto. Essa tendência abrange tanto produtos crus quanto pré-cozidos
- Bactérias ácido-láticas (BAL) são microrganismos frequentemente encontrados em produtos cárneos processados, curados e embalados a vácuo, podendo contribuir para alterações na qualidade desses alimentos.
- Globalmente, a bactéria *Salmonella enterica* figura entre as principais causas de doenças transmitidas por alimentos, responsáveis por surtos frequentes e elevadas taxas de mortalidade, tornando-se um problema de saúde pública relevante.
- Investigar o comportamento desses microrganismos em culturas mistas (co-cultivo) é fundamental para entender a dinâmica da competição entre as cepas e desenvolver estratégias eficazes para minimizar o crescimento desses microrganismos.
- Embora a identificação e quantificação precisas desses microrganismos em alimentos sejam essenciais, os métodos tradicionais de contagem microbiana apresentam limitações significativas, como tempo prolongado e potencial falta de precisão devido à dificuldade em distinguir colônias com características morfológicas semelhantes, vivas, injuriadas ou mortas, em ambientes de crescimento misto.
- O uso do método molecular PMA-qPCR e a aplicação de modelos matemáticos preditivos abrem caminho para uma compreensão mais aprofundada da microbiota de produtos cárneos, permitindo uma descrição mais precisa do comportamento de BAL deteriorantes e *S. enterica*.

O que já foi feito?

- O campo da análise microbiológica de produtos cárneos conta com modelos preditivos já desenvolvidos para o estudo individual do comportamento de BAL deteriorantes e *S. enterica*, possibilitando uma compreensão mais aprofundada desses microrganismos em condições de temperatura variadas.
- A aplicação conjunta de modelos preditivos de interação microbiana e do método PMA-qPCR para investigar a dinâmica competitiva entre BAL e *S. enterica* em presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo ainda não foi documentada na literatura.

Hipótese do trabalho

- A construção de um modelo preditivo molecular baseado na técnica PMA-qPCR abre caminho para a previsão precisa do comportamento de BAL e *S. enterica* em monocultivos (puros) e, permitindo a avaliação da dinâmica de cada bactéria em co-cultura e a identificação de potenciais inibições de crescimento.
- O modelo proposto teria a capacidade de distinguir entre as bactérias morfologicamente semelhantes em amostras de presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo em diferentes temperaturas, reforçando a importância da cadeia de frio.

Metodologia Experimental

- Apresentar um novo protocolo de PMA-qPCR validado para a identificação e quantificação de BAL e *S. enterica* em monocultivo e co-cultivo em amostras de presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo.
- O uso de cepas em coquetel para desenvolver modelos preditivos pode aumentar a confiança na capacidade do modelo de prever com precisão a gama completa de cenários ambientais.
- Estabelecer modelos preditivos que combinem com método convencional de contagem em placa (CP) e com o método molecular PMA-qPCR para avaliar o comportamento de BAL (*Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella viridescens*) e *S. enterica* em presunto de peru defumado, fatiado, embalado a vácuo e armazenado em diferentes temperaturas (8, 10, 12, 16 e 20 °C).

Respostas

- Desenvolvimento de modelos preditivos moleculares para descrever o crescimento de bactérias deteriorantes e de bactérias patogênicas, tanto em monocultivo quanto em co-cultivo, em presunto de peru defumado, fatiado, embalado a vácuo e armazenado em temperaturas de refrigeração e temperaturas de abuso.
- Investigar a interação entre *S. enterica* e BAL após inoculação artificial, abrindo caminho para pesquisas futuras sobre a inibição de patógenos na presença de microrganismos deteriorantes.

APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO

Esta tese de doutorado é apresentada em capítulos, onde a metodologia de cada fase do estudo, assim como os resultados e discussões correspondentes, serão apresentados em capítulos. Os capítulos 3 e 4 estão formatados como artigos científicos, conforme delineado abaixo. As referências bibliográficas de todos os capítulos da tese estão listadas ao final do documento. Conforme descrito a seguir:

- Capítulo 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

- Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Capítulo 3. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE CONTAGEM DE PLACAS E PMA-QPCR PARA MODELAR O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM PRESUNTO DE PERU DEFUMADO.

Este capítulo será apresentado na forma de artigo científico.

- Capítulo 4. ENSAIO DE QPCR COM PROPÍDIO MONOAZIDA (PMA) COMPARADO AO MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA PARA QUANTIFICAR O CRESCIMENTO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA ENTERICA* EM PEITO DE PERU EMBALADO A VÁCUO, COMBINADO COM UMA ABORDAGEM DE MODELAGEM MATEMÁTICA.

Este capítulo será apresentado na forma de artigo científico.

- Capítulo 5. MODELAGEM DA INTERAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E *Salmonella enterica* EM PRESUNTO DE PERU EMBALADO A VÁCUO SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS

- Capítulo 6. CONCLUSÃO GERAL

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne de peru tem se destacado entre os produtos cárneos do mercado brasileiro, com produção de 133,3 mil toneladas em 2023 e exportação de 69,8 mil toneladas, segundo Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2024). O presunto de peru é um produto processado que pode ser feito a partir do peito ou da perna da ave e, como outros produtos, sua qualidade depende da qualidade da matéria-prima e do método de produção (Feiner, 2006; Iqbal et al., 2010).

Devido à sua conveniência, os produtos de carne e aves prontos para consumo (do inglês: *ready-to-eat* - RTE) representam uma categoria significativa de alimentos processados apreciados em várias partes do mundo (Harita et al., 2018). Sabe-se que os alimentos RTE não são submetidos a nenhum processamento térmico antes do consumo. Consequentemente, estão constantemente suscetíveis à contaminação cruzada por diversos microrganismos, incluindo bactérias patogênicas.

Salmonella é uma bactéria patogênica, com formato de bacilo, Gram-negativo e anaeróbio facultativo que comumente causa intoxicação alimentar em humanos. Os sorotipos Enteritidis e Typhimurium de *Salmonella enterica* não tifoide são comuns, no mundo inteiro, contribuindo significativamente para a morbidade e mortalidade descritas na saúde pública (Stanaway et al., 2019).

Além das bactérias patogênicas, há a preocupação com a degradação destes produtos. O crescimento microbiano é o principal fator de deterioração de carnes e produtos cárneos (Ji et al., 2021), mesmo quando armazenados sob refrigeração, tornando-os inadequados para consumo (Marmion et al., 2021; Nychas et al., 2008; Saenz -Garcia et al., 2020). Este processo de deterioração está ligado a bactérias deteriorantes, como as bactérias ácido lácticas (BAL), particularmente as espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella viridescens* (anteriormente *Lactobacillus viridescens*) (Collins et al., 1993).

O grupo de pesquisa em microbiologia preditiva do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da UFSC possui ampla experiência na aplicação de modelos preditivos para descrever o comportamento de microrganismos deteriorantes em produtos cárneos. No entanto, os dados para a modelagem do crescimento microbiano eram obtidos por métodos convencionais de identificação microbiana, como os métodos da contagem em placa (CP) e da determinação da turbidez (DO).

Em 2015, Camargo (2015) iniciou o uso do método da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) para obter dados quantitativos de crescimento de *Latilactobacillus sakei*

(anteriormente *Lactobacillus sakei*), *Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente *Lactobacillus plantarum*) e *W. viridescens* em meio de cultivo. No entanto, os iniciadores de qPCR selecionados na literatura não apresentaram a especificidade necessária para a amplificação das BAL.

Para superar essa limitação, Severo (2018) desenvolveu uma pesquisa que possibilitou a obtenção de dados de crescimento de *L. mesenteroides*, em cultura pura e mista, em meio de cultivo, utilizando a técnica SYBR® Green qPCR. Esses dados foram posteriormente utilizados para a modelagem preditiva do crescimento dessa bactéria. Juntamente com este estudo, foi conduzida uma investigação em cultura mista envolvendo as BAL *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, marcando o início de pesquisas em cultura mista no âmbito do grupo de pesquisa.

Kautzmann (2019) desenvolveu um modelo não isotérmico para o crescimento de *L. mesenteroides*, incorporando temperaturas isotérmicas de Severo (2018) e a técnica SYBR® Green qPCR. A validação do modelo permitiu a obtenção de dados de crescimento não isotérmicos, se tornando o primeiro trabalho do grupo realizado em condições não isotérmicas de cultivo, utilizando técnicas moleculares.

Martins (2019) iniciou sua pesquisa utilizando o método SYBR® Green qPCR em meio de cultura, posteriormente migrando para o método TaqMan® qPCR para quantificar *W. viridescens* e *L. mesenteroides* em produtos cárneos embalados a vácuo. Além disso, um experimento em cultura mista foi realizado a 8 °C utilizando as BAL *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, incorporando dados de *L. mesenteroides* obtidos por Severo (2018). Os resultados de Martins (2019) demonstraram a efetividade do método TaqMan® qPCR para a quantificação dessas BAL em produtos cárneos.

No entanto, o método qPCR apresenta algumas limitações, como a impossibilidade de diferenciar células viáveis de não viáveis. Essa característica pode levar à superestimação dos resultados, uma vez que o DNA permanece nas amostras mesmo após a morte celular. Para superar essa limitação, o uso de corantes como o monoazide de propídio (PMA) pode ser utilizado. O PMA penetra apenas nas células não viáveis, impedindo sua amplificação na reação de qPCR.

A literatura não apresenta pesquisas que combinem o método PMA-qPCR com a microbiologia preditiva para descrever o comportamento de BAL e *S. enterica* (cultura pura e mista) em presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo (PPF).

A modelagem de cultura mista oferece uma representação mais realista do comportamento de um microrganismo, pois leva em consideração as interações entre as

populações microbianas. Essas interações podem resultar em inibições, seja por competição por substrato ou pela produção de metabólitos (VAN IMPE et al., 2005).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Comparar a eficácia dos métodos PMA-qPCR e contagem em placa na modelagem preditiva do crescimento e das interações de bactérias ácido-láticas e *Salmonella enterica* em presunto de peru defumado.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter a curvas padrão para um coquetel de três sorotipos de *S. enterica* e coquetel de BAL (*L. mesenteroides* e *W. viridescens*) em diferentes condições de temperatura de armazenamento, incluindo temperaturas de refrigeração (8 °C e 10 °C) e abuso de temperatura (12 °C, 16 °C e 20 °C)
- Avaliar o crescimento de *S. enterica* e BAL sob temperaturas isotérmicas por PMA-qPCR e CP;
- Investigar a concordância e correlação entre os métodos de quantificação microbiana CP e PMA-qPCR na determinação do crescimento de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* através de análises comparativas;
- Aplicar ferramentas de microbiologia preditiva para modelar o crescimento de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica*, utilizando modelos primários e secundários;
- Avaliar e modelar a interação entre *L. mesenteroides* e *W. viridescens* sobre *S. enterica* em presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo sob condições de temperatura de armazenamento isotérmicas (8, 10, 12, 16 e 20 °C);

- Analisar a capacidade de modelos de interação microbiana para prever o efeito inibitório de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* sobre *S. enterica*.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARNE DE PERU E INDUSTRIALIZADOS

O peru (Galliformes pertencente ao gênero *Maleagris*) é uma ave nativa das Américas. Um segmento em ascensão na indústria avícola é a produção de carne de peru e seus derivados, que estão gradualmente ganhando popularidade no mercado devido ao seu alto valor proteico e baixo teor de gordura e colesterol. O crescente interesse em hábitos alimentares saudáveis tem impulsionado não apenas a diversificação dos produtos à base de carne de peru, mas também a expansão do seu consumo em nível global. (Cavalcanti *et al.*, 2021).

De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2023, a produção de carne de peru atingiu 133,29 mil toneladas. Desse total, 52,39% foram destinados ao mercado externo. Em relação às exportações, os produtos industrializados representaram 10,77% da produção, sendo a União Europeia (67,36%), a América (17,50%) e a África (8,99%) os principais mercados compradores desses produtos (ABPA, 2024).

O presunto de peru é um produto industrializado com alta atividade de água, rico em substâncias nitrogenadas e minerais. Seu pH favorável ao desenvolvimento microbiano torna sua composição química ideal para o crescimento de microrganismos (Franco; Landgraf, 2023). Estudos da microbiota natural de presunto de peru comercial revelaram a presença de BAL, como *Leuconostoc carnosum* e *W. viridescens*, com predominância das espécies *L. mesenteroides* e *L. sakei*, responsáveis pela deterioração do produto (Samelis; Kakouri; Rementzis, 2000a). Além disso, a avaliação da vida útil de presunto de peru é crucial para garantir a comercialização do produto. Além das bactérias deteriorantes, pesquisas indicaram o crescimento de bactérias patogênicas em presunto de peru como *Listeria monocytogenes* (Pal; Labuza; Diez-Gonzalez, 2008) e *Salmonella* spp. (Dow; Alvarado; Brashears, 2011; Possas *et al.*, 2017), enfatizando a importância de estudos sobre a vida útil de presunto de peru, considerando o crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas.

2.2 A IMPORTÂNCIA DA TEMPERATURA NA CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

A manutenção da cadeia de frio de um sistema de transporte e armazenamento é importante para manter a temperatura controlada para produtos refrigerados, visando preservar sua qualidade e segurança (Montanari, 2008; Ndraha *et al.*, 2018).

Manter a temperatura de refrigeração estável é crucial, ajustada de acordo com a natureza dos produtos e o tempo de armazenamento planejado. No caso de produtos cárneos, a circulação de ar dentro das câmaras frigoríficas é essencial para garantir um resfriamento eficaz e uma distribuição uniforme da temperatura (Hui, 2006).

A quebra da cadeia de frio impacta diretamente a vida útil e/ou na segurança de alimentos refrigerados, sendo as carnes e seus derivados um dos grupos mais afetados. Essa deterioração se deve à proliferação de microrganismos mesófilos com características psicrotróficas e anaeróbias facultativas. Tsafraquidou *et al.* (2021) avaliaram a deterioração de frango caipira embalado sob atmosfera modificada e armazenado a 4 °C. Observou-se o crescimento de BAL, com *L. sakei* e *Leuconostoc* spp. como cepas dominante e subdominante, respectivamente, na deterioração. Apesar de não atingirem a concentração de 7 log₁₀ UFC/g, todas as amostras apresentaram odores sulfúricos e estufamento da embalagem a partir do sétimo dia de armazenamento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Samelis, Kakouri e Rementzis (2000b) ao estudarem a microbiota natural de peito de peru cozido embalado a vácuo, defumado e não defumado, com armazenamento a 4 °C. A predominância de *L. sakei* foi observada na deterioração do peito de peru defumado, *L. mesenteroides* na microbiota das amostras não defumadas e a presença de *W. viridescens* em sua microbiota natural. Após duas semanas de armazenamento, todas as amostras apresentaram estufamento das embalagens, fortes odores, sabores ácidos e formação de limo.

Vale salientar que, além das BAL, a *S. enterica* se apresenta como um patógeno mesófilo com capacidade de crescer e sobreviver sob refrigeração e temperaturas de abuso. Portanto, o controle rigoroso da temperatura e a manutenção das condições adequadas da cadeia de frio são fundamentais para garantir a segurança dos alimentos.

2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL)

As BAL são Gram-positivas, não formadoras de esporos, microaerófilas e anaeróbias facultativas, frequentemente encontradas na forma de cocos ou bacilos. Geralmente são mesófilas, com temperatura ótima de crescimento situada entre 30 e 35 °C (Axelsson; Nystrom; Lindhe, 2004; Carr; Chill; Maida, 2002; Rodriguez De Massaguer, 2006), podendo crescer a temperaturas de refrigeração (Comi; Iacumin, 2012; Dalcanton, 2010).

Anteriormente composto por 14 gêneros, as BAL passaram por modificações significativas na sua classificação. Zheng e colaboradores (2020) propuseram uma

reclassificação do gênero *Lactobacillus*. Nesse estudo, os pesquisadores examinaram a taxonomia das famílias Lactobacillaceae e Leuconostocaceae, utilizando sequências do genoma completo. Foram considerados parâmetros como filogenia do genoma central, identidade média de pares de aminoácidos, critérios fisiológicos e a ecologia dos organismos. Com base nessa análise abrangente, propuseram a reclassificação do gênero *Lactobacillus* em 25 novos gêneros. Assim, o grupo das BAL proposto é constituído por 31 gêneros, denominados *Weissella*, *Oneococcus*, *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Lentilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Pediococcus*, *Ligilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Loigolactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Amylolactobacillus* e *Holzapfelia*.

Embora tenham vários efeitos benéficos nos alimentos, as BAL também podem contribuir para a deterioração precoce desses. São notáveis na deterioração de produtos cárneos processados, curados, embalados a vácuo ou sob atmosfera modificada, e armazenados em temperaturas de refrigeração (Borch; Kant-Muermans; Blixt, 1996; Martins *et al.*, 2019; Samelis; Kakouri; Rementzis, 2000a). A deterioração da carne está associada à produção de metabólitos que causam alterações na textura, aparência e sabor, além de gerar odores indesejáveis e formação de limo na superfície do produto.

As bactérias dos gêneros *Leuconostoc* e *Weissella* estão entre as BAL mais frequentemente associadas à deterioração de alimentos e são encontradas em diversos produtos cárneos, incluindo carne fresca embalada a vácuo, além de produtos cárneos processados e fermentados (Comi *et al.*, 2016; Dušková; Kameník; Karpíšková, 2013; García-Gimeno *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005).

2.3.1 Gênero *Leuconostoc*

O gênero *Leuconostoc* foi definido por Van Thieghem (1878), com o termo originado das palavras “Nostoc”, referindo-se a uma alga azul mucilagínosa, e “Leuco”, que significa branco. Inicialmente, esse gênero foi observado na forma de cordões, com aspecto mucilagínoso e sem pigmentação, sendo as primeiras cepas isoladas de eventos em fábricas de açúcar (Devoyod; Poullain, 1988).

As BAL desse gênero são cocos imóveis e não formadores de esporos, comumente encontrados em pares ou cadeias curtas. São Gram-positivas e catalase negativas, além de serem heterofermentativas, o que significa que têm a capacidade de produzir CO₂, lactato e etanol a partir do metabolismo da glicose. São anaeróbias facultativas, mesófilas e têm capacidade de crescimento em baixas temperaturas (Hemme; Foucaud-Scheunemann, 2004).

As BAL do gênero *Leuconostoc* são encontradas em diversos ambientes e têm origem em vegetações verdes e raízes, que constituem seu nicho ecológico natural (Mundt, 1970).

2.3.1.1 Espécie *Leuconostoc mesenteroides*

A espécie *L. mesenteroides* é composta por 4 subespécies: *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *L. mesenteroides* subsp. *suionicum* (Garvie, 1983; (Gu *et al.*, 2012). As cepas de *L. mesenteroides* crescem idealmente a 30 °C, mas também são capazes de crescer em temperaturas mais baixas, com a maioria das cepas crescendo bem a 4 °C (Hamasaki *et al.*, 2003; Severo, 2018).

L. mesenteroides possui uma forte ligação com a indústria de alimentos devido às suas características positivas. É frequentemente utilizada como cultura inicial para a produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas (Drosinos; Mataragas; Metaxopoulos, 2006), exopolissacarídeos com atividade antioxidante (Li, Yang *et al.*, 2020), contribui para a formação de aromas em queijos (van Mastrigt *et al.*, 2019) e produção de dextranas com potencial prebiótico (Kothari; Tingirikari; Goyal, 2015), entre outros usos.

Apesar de suas aplicações benéficas, essa espécie também pode causar perdas comerciais, sendo associada à deterioração de produtos cárneos (Diez *et al.*, 2009; Drosinos; Mataragas; Metaxopoulos, 2006; Hamasaki *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2020). *L. mesenteroides* contribui para a alteração de produtos alimentícios através da fermentação de açúcares, resultando na produção de ácido lático, limo e CO₂, levando à redução do pH e ao surgimento de odores e sabores indesejados. Isso afeta as características sensoriais do produto e sua aceitação pelo consumidor (Veld, 1996).

2.3.2 Gênero *Weissella*

O gênero *Weissella* foi originalmente definido por Collins *et al.*, (1993), após estudos taxonômicos sobre microrganismos semelhantes ao gênero *Leuconostoc*. Através de análises bioquímicas, observou-se que essas bactérias apresentavam diferenças em relação a outras espécies de *Leuconostoc*. Além disso, estudos moleculares do gene 16S rRNA permitiram a distinção do novo gênero *Weissella* (Collins *et al.*, 1993).

As BAL do gênero *Weissella* são classificadas como Gram-positivas, catalase negativas e não formadoras de esporos, com morfologia em forma de cocos ou bastonetes. São anaeróbias facultativas e fermentam a glicose de forma heterofermentativa (Collins *et al.*, 1993; Diez *et al.*, 2009). Esse gênero é composto por 19 espécies, incluindo *W. soli*, *W. diestrammenae*, *W. koreensis*, *W. kandleri*, *W. oryzae*, *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. thailandiaensis*, *W. hellenica*, *W. paramesenteroides*, *W. ceti*, *W. halotolerans*, *W. viridescens*, *W. minor*, *W. uvarum*, *W. beninensis*, *W. fabalis*, *W. fabaria* e *W. ghanensis* (Fusco *et al.*, 2015).

2.3.2.1 Espécie *Weissella viridescens*

Inicialmente denominada como *Lactobacillus viridescens*, essa espécie foi reclassificada como *W. viridescens* por Collins e colaboradores em 1993. A espécie *W. viridescens* é encontrada em diversos tipos de alimentos, incluindo vegetais, legumes, mandioca, silagem, carnes e produtos cárneos (Comi; Iacumin, 2012; Doulgeraki *et al.*, 2012; Fusco *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2011; Patterson *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Assim como a espécie *L. mesenteroides*, *W. viridescens* é comumente utilizada como cultura inicial em fermentados para a produção de exopolissacarídeos com potencial prebiótico (Kavitake; Devi; Shetty, 2020) e como cultura protetora contra *L. monocytogenes* (Stratakos *et al.*, 2016).

Apesar de desempenhar papéis benéficos, essa espécie também é frequentemente associada à deterioração de produtos cárneos, como presunto de peito de peru curado e cozido (Samelis; Kakouri; Rementzis, 2000a), presunto fatiado e embalado a vácuo (Menezes *et al.*, 2018a) e morcilla (salsicha de sangue típica da Espanha) (Diez *et al.*, 2009; Gómez-rojo *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2020). Esses produtos requerem armazenamento em temperaturas de refrigeração e são frequentemente embalados a vácuo ou em atmosfera modificada para prolongar sua vida útil.

2.4 *SALMONELLA* SPP.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae e são anaeróbias facultativas, Gram-negativas, catalase-positivas, oxidase-negativas e apresentam forma de bastonetes. As cepas de *Salmonella* spp. geralmente são imóveis e capazes de produzir ácido e gás a partir da glicose. São tipicamente mesófilas, com uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C e uma faixa de crescimento entre 5 e 45 °C (Brands *et al.*, 2005).

Embora a classificação taxonômica de *Salmonella* spp. esteja em constante atualização, análises de hibridização de DNA e sequenciamento da fração 16S do RNA ribossomal indicam que, atualmente, o gênero é formado por duas espécies apenas: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Enquanto a espécie *S. bongori* não tem subespécie, a espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies, denominadas: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (Franco; Landgraf, 2023). *S. enterica* é comumente associada a humanos e animais de sangue quente, enquanto *S. bongori* é encontrada em animais de sangue frio, sendo infecções humanas muito incomuns (Yuting *et al.*, 2021).

O Instituto Pasteur em Paris, França, abriga o Centro de Referência e Pesquisa em *Salmonella* spp., responsável pela atualização da taxonomia desse gênero. A classificação dos sorotipos dentro do gênero é realizada por meio de uma classificação sorológica, inicialmente proposta por White em 1926 e posteriormente expandida por Kauffmann em 1941, dando origem à classificação conhecida como Kauffmann-White. Essa classificação é baseada na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e, quando presente, capsulares (Vi) (Jay; Loessner; Golden, 2005).

Cada uma das espécies de *S. enterica* é composta por vários sorotipos, em um total de 2.636. *S. bongori* tem 23 sorotipos, perfazendo um total de 2.659 sorotipos para o gênero *Salmonella*. A nomenclatura dos sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* geralmente é derivada do local geográfico onde o sorotipo foi inicialmente isolado. Com base no sistema de nomenclatura moderno, a citação da espécie e subespécie é frequentemente omitida, mantendo-se apenas o sorotipo, que não é itálico e é iniciado com letra maiúscula. Assim, neste trabalho, por exemplo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium será citada simplesmente como *Salmonella* Typhimurium ou *S. Typhimurium*. Os sorotipos das outras subespécies são denominados com base em suas fórmulas antigênicas, seguindo o nome da subespécie (Franco; Landgraf, 2023).

A *S. enterica* é um patógeno de origem alimentar, facultativamente intracelular invasivo, capaz de causar diversas doenças em seres humanos. As manifestações clínicas da salmonelose podem incluir gastroenterite, septicemia ou febre entérica. Os sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são frequentemente associados à gastroenterite, enquanto os sorotipos *S. Typhi* e *S. Paratyphi* são responsáveis pela febre entérica, sendo patógenos específicos para humanos (Andino; Hanning, 2015; Kehl; Noster; Hensel, 2020).

2.4.1 *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*

Entre os mais de 2.600 sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*, os sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* destacam-se como os mais comuns em surtos alimentares em todo o mundo (Spector; Kenyon, 2012). Esses sorotipos têm sido responsáveis por milhões de casos de infecções alimentares, resultando em milhares de hospitalizações e óbitos em escala global, tornando a salmonelose uma das doenças infecciosas mais prevalentes e uma séria preocupação de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, alimentos contaminados por *Salmonella* spp. ocuparam o segundo lugar nas estatísticas de surtos identificados no período de 2009 a 2018, representando 11,3% dos casos (Brasil, 2018; Li, Ying *et al.*, 2020; Scallan *et al.*, 2011).

Outro sorotipo relevante é a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Heidelberg (*S. Heidelberg*), que emergiu como um dos principais agentes de contaminação na produção avícola, evidenciado por seu envolvimento em surtos relacionados ao consumo de produtos avícolas contaminados (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013; Foley *et al.*, 2011; Gieraltowski *et al.*, 2016). No Brasil, *S. Heidelberg* foi identificada pela primeira vez em 1962, em aves e produtos derivados (Hofer; Silva Filho; Reis, 1997). A Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece padrões microbiológicos para alimentos prontos para consumo, exigindo ausência de *Salmonella*/25 g para produtos cárneos de aves cozidos inteiros ou em cortes, defumados ou não (Brasil, 2019).

No Brasil, 25,5% das contaminações por *Salmonella* spp. em alimentos foram provenientes de alimentos mistos (compostos por mais de um grupo alimentar), seguidos pela água, representando 21,1%. Além disso, produtos cárneos como carne bovina *in natura*, processada e miúdos representaram 5,3% das contaminações, enquanto carne de aves *in natura*, processada e miúdos representaram 3,5%, e carne suína *in natura*, processada e miúdos correspondem a 2,0% das contaminações por *Salmonella* spp. em alimentos (Brasil, 2018). Entre 2014 e 2023, foram registrados 1.644 surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e

Alimentar (DTHA) no Brasil. A *Salmonella* spp. foi o terceiro agente etiológico mais frequentemente identificado em surtos de DTHA, correspondendo a 9,6% dos casos no país (Brasil, 2024).

Produtos avícolas frequentemente estão associados a surtos alimentares, com *Salmonella* spp. como agente etiológico, sendo os sorotipos *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium* os mais comumente associados a ovos e aves, especialmente frango e peru (Scallan *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2022).

A epidemiologia da *Salmonella* spp. e outros agentes de doenças transmitidas por alimentos tem evoluído devido às mudanças na produção e no consumo de alimentos industrializados, bem como à crescente demanda por alimentos prontos ou minimamente processados. A *Salmonella* spp. é a segunda causa mais comum de doenças transmitidas por alimentos em humanos (Besser, 2018).

Para minimizar a contaminação por *Salmonella* spp. em alimentos, vários métodos e tratamentos têm sido sugeridos na literatura. Por exemplo, o tratamento combinado de alta pressão com trans-cinamaldeído para inativação de *Salmonella* spp. em tomates foi proposto por Zhou *et al.* (2020) e demonstrou eficácia, resultando em redução de até 6 log₁₀ UFC/g. Além disso, o uso de antimicrobianos como óleo essencial de mostarda branca e carvacrol, embalagem a vácuo e tratamento com irradiação têm sido relatados como métodos eficazes para inativar *Salmonella* spp. em alimentos (Mohammad *et al.*, 2019; Porter; Morey; Monu, 2020).

Apesar da implementação desses métodos, que estendem a vida útil e aumento da segurança dos alimentos, o risco de salmonelose continua presente. Alguns pesquisadores têm explorado o uso de BAL como culturas bioprotetoras que podem apresentar propriedades inibitórias, produzindo uma variedade de substâncias que limitam o crescimento de populações bacterianas e podem competir ou inibir outros microrganismos prejudiciais e patogênicos (Costa *et al.*, 2019; Coton *et al.*, 2018; Milani *et al.*, 2024; Møller *et al.*, 2013).

2.5 INTERAÇÃO MICROBIANA ENTRE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

O grupo das BAL é composto por gêneros microbianos que compartilham características fenotípicas comuns, como: serem cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase negativos e não esporulados. Embora seja fácil criar categorias para classificar os microrganismos, é bastante desafiador determinar a qual categoria pertence um microrganismo específico, já que ele pode ter atividades diferentes em alimentos distintos. Assim, um

microrganismo pode causar deterioração em um alimento, mas as reações químicas que provocam essa deterioração podem ser desejáveis em outro alimento. No entanto, a principal característica distintiva desse grupo é a capacidade de fermentar açúcares, conferindo-lhe a função tecnológica de desenvolver sabor, aroma e textura, além de promover a conservação de alimentos. Essa capacidade conservante está associada à diminuição do pH, resultante da produção de ácidos orgânicos, e à produção de agentes antimicrobianos, como as bacteriocinas (Oliver; Jayarao; Almeida, 2005).

As BAL empregam diversos mecanismos de competição para garantir seu domínio no ambiente alimentar, os quais podem ser classificados em duas categorias: diretos e indiretos. Mecanismos de competição direta - Liberação de metabólitos antagonistas: as BAL produzem bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos com ação específica contra microrganismos patogênicos ou competidores indesejáveis, e ácidos orgânicos, como ácido lático, ácido acético e ácido fórmico, que diminuem o pH do meio, tornando-o desfavorável para o crescimento de microrganismos indesejáveis. Mecanismos de competição indireta - Competição por nutrientes: as BAL competem ativamente por nutrientes essenciais, como açúcares e aminoácidos, com microrganismos indesejáveis. A alta taxa de consumo desses nutrientes pelas BAL pode limitar a disponibilidade para outros microrganismos, dificultando seu crescimento (das Dores; Ferreira, 2012)

Efeito Jameson é um mecanismo que foi descrito por Jameson em 1962, e que demonstra que uma espécie microbiana dominante pode suprimir o crescimento de outra espécie, mesmo quando esta última possui maior velocidade de crescimento individual. Essa supressão ocorre pela rápida depleção de um nutriente essencial, indispensável para o crescimento da espécie competidora. O efeito Jameson representa um tipo de competição interespecie caracterizada pela utilização eficiente de recursos do ambiente, favorecendo o crescimento e a densidade populacional de determinadas espécies em detrimento de outras.

Esse efeito é observado em alimentos ricos em BAL, como comprovado por estudos que investigaram a interação entre BAL e patógenos como *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. (Costa *et al.*, 2019; Møller *et al.*, 2013). A combinação de mecanismos de competição direta e indireta, empregados pelas BAL, contribui significativamente para a segurança microbiológica dos alimentos.

2.6 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA

Entre os métodos mais utilizados, que se baseiam em procedimentos convencionais de cultura bacteriana, destacam-se os turbidimétricos, incluindo a espectrofotometria da densidade óptica (DO), o método do número mais provável (NMP) e a contagem em placa (CP) que se destaca como padrão ouro dos métodos convencionais de contagem de células.

O método NMP ainda é utilizado para quantificar a contaminação bacteriana em amostras. Ele envolve a inoculação de diluições decimais em tubos de meio de cultura, a observação dos resultados e o cálculo do número estimado de bactérias usando uma tabela NMP padrão baseada em análise estatística. O método NMP foi aplicado na quantificação de *Salmonella* spp. (Cavada; Cardoso, 2010) e, mais recentemente, foi combinado com o método de qPCR para desenvolver uma técnica rápida para quantificar *S. Typhimurium* (Kim *et al.*, 2017).

A análise de DO é um método turbidimétrico simples e rápido, mas não distingue células viáveis de não viáveis, não permite a obtenção direta da concentração celular e apresenta baixa sensibilidade. Como o método NMP, é utilizado para confirmar o crescimento de uma cultura (Stremel *et al.*, 2013). Além disso, é incapaz de detectar concentrações bacterianas inferiores a 10^5 ou 10^6 UFC/mL (Dalcanton, 2010).

O método CP se destaca como a técnica mais empregada na determinação da concentração de uma população bacteriana. Em comparação com o método de DO, o CP apresenta a vantagem de quantificar apenas células viáveis. No entanto, o método também possui algumas desvantagens, como o tempo de incubação prolongado, geralmente entre 24 e 48 horas para o aparecimento de colônias viáveis em placas, e a incapacidade de diferenciar microrganismos com características morfológicas semelhantes.

2.6.1 Contagem em placa (CP)

Entre as rotinas de análises microbiológicas mais utilizadas, o método clássico de CP se destaca para quantificação de bactérias. Baseado no cultivo, o método permite o isolamento de colônias viáveis. No entanto, a obtenção dos resultados geralmente requer um período de 2 a 3 dias, podendo ser superior (Huang *et al.*, 2021).

O método de CP, amplamente utilizado há décadas para quantificação microbiana em carnes e produtos industrializados tendo sido empregado na quantificação de bactérias aeróbias

em amostras de frango irradiado (Heath *et al.*, 1990), entre outros. Desde então, sua aplicação na quantificação de microrganismos em produtos cárneos se mantém robusta. Estudos recentes relatam o uso do método CP para quantificar bactérias deteriorantes e patogênicas em frango (Katiyo *et al.*, 2020), carne de peru (Manjankattil *et al.*, 2024) e carne bovina (Kiprotich *et al.*, 2023). Além disso, a combinação do método de CP com outras técnicas vem ganhando destaque. Estudos já relatam o uso combinado de técnicas com o método CP em alimentos, como qPCR e sequenciamento em carne de frango (Cha *et al.*, 2023) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz, espectrometria de massa de tempo de voo e o sistema VITEK® em miúdos de frango (Gamil *et al.*, 2024).

Embora ainda amplamente utilizado, o método de CP apresenta algumas limitações, entre as quais se destaca a incapacidade de diferenciar células morfológicamente semelhantes. De fato, a distinção entre espécies de bactérias do gênero *Weissella* e espécies do gênero *Leuconostoc*, ou ainda *Latilactobacillus*, baseando-se apenas em características fenotípicas, é um desafio (Collins *et al.*, 1993).

2.7 MÉTODOS MOLECULARES NA MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

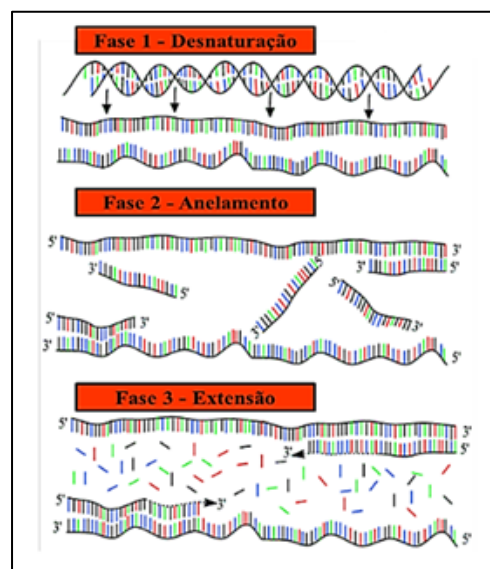
A biologia molecular vivenciou um avanço acelerado nos últimos anos. A pesquisa na área médica liderou o desenvolvimento de técnicas que, gradativamente, foram adotadas pela indústria de alimentos para a identificação e caracterização de microrganismos de relevância alimentar. Um dos métodos moleculares que se tornou proeminente na área de microbiologia de alimentos é o qPCR, agora comum em laboratórios, instituições de ensino e pesquisa (Flint, 2016). Diversos estudos empregaram essa metodologia para identificar microrganismos deteriorantes e patogênicos em carnes e derivados, como carne de frango (Cha *et al.*, 2023; Parry-Hanson Kunadu; Otwey; Mosi, 2020), entre outros estudos.

2.7.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

Em 1984, a técnica de PCR foi descoberta por Kary Mullis, representando uma verdadeira revolução na área científica. Posteriormente, em 1993, Higuchi e colaboradores desenvolveram a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR), que possibilita a detecção e quantificação da expressão gênica em tempo real (Deepak *et al.*, 2007; Higuchi *et al.*, 1993).

A PCR consiste em ciclos consecutivos divididos em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão (Figura 2.1), cada uma ocorre a uma temperatura específica. Na fase de desnaturação, o DNA genômico contendo a sequência-alvo é desnaturado, ocorrendo a desintegração da dupla hélice por aquecimento, gerando duas fitas simples. Na etapa seguinte, o anelamento, a temperatura é reduzida e os iniciadores (*primers*) se ligam às fitas simples de DNA a serem amplificadas. Por fim, na fase de extensão, a temperatura é novamente elevada para otimizar a atividade da enzima DNA polimerase, permitindo a extensão dos iniciadores e a formação de novas fitas de DNA.

Figura 2.1 Fases de um ciclo de um ensaio de qPCR.



Fonte: Adaptado de Vierstraete (1999).

A técnica de qPCR teve sua origem na união de uma câmera de vídeo CCD (*Charge-Coupled Device*) a um sistema de PCR convencional. Essa inovação permitia o monitoramento da PCR em tempo real, acompanhando o aumento da fluorescência durante a reação. A fluorescência é gerada pela ligação do corante brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla hélice recém-sintetizadas (Oliveira, 2009).

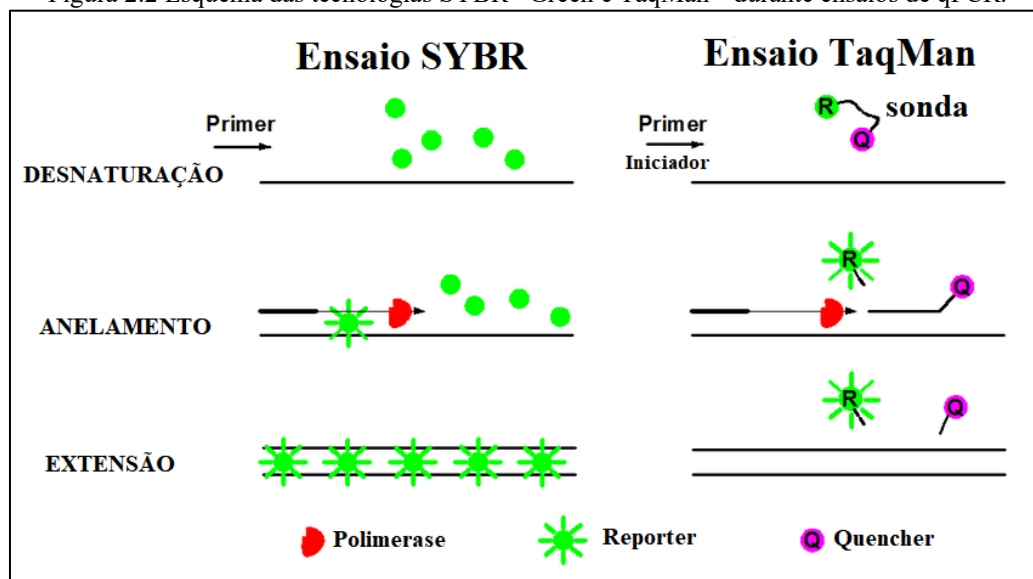
Posteriormente, a qPCR evoluiu para um sistema tubular com câmeras detectoras refrigeradas acopladas a um termociclador. Esse sistema possibilita a detecção da luz fluorescente emitida durante a reação, com a ressonância emitida sendo diretamente proporcional à intensidade da fluorescência. O equipamento também conta com um sistema informatizado com *software* dedicado à separação, quantificação e interpretação do espectro gerado (Bustin, 2000, 2002).

Em um determinado momento da reação, a fluorescência ultrapassa um limiar arbitrário definido pelo *software* da qPCR, o que indica o início da fase exponencial. Esse ponto corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação atinja um nível detectável, ou seja, ultrapasse o limiar estabelecido, conhecido como “cycle threshold” (C_T) ou “ciclo de quantificação” (C_q) (Heid *et al.*, 1996; Kubista *et al.*, 2006).

Ao longo dos anos, diversos métodos de detecção de sequências-alvo foram desenvolvidos, incluindo o uso de corantes específicos (SYBR® Green, EVA® Green, SYTO®), tecnologias baseadas em iniciadores (primer LUX, AmpliFluor, Plexor), o sistema de sondas TaqMan™ (5'exonuclease), transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET), balizas moleculares e sondas scorpion. Cada tipo de sonda promove a detecção dos fragmentos amplificados de maneira distinta (Glynn *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2015).

Entre as técnicas mais utilizadas em reações de qPCR, destacam-se as tecnologias SYBR® Green e TaqMan™ (Figura 2.2). Na tecnologia SYBR® Green, o corante se liga à dupla hélice formada durante a fase de extensão e emite fluorescência para quantificar os produtos da PCR. Já na tecnologia TaqMan™, a atividade 5'-3' exonucleolítica da enzima Taq DNA Polimerase é explorada. A mistura de reação contém sondas fluorogênicas compostas por um oligonucleotídeo com um fluoróforo (repórter) e um elemento que emite ressonância, denominado “quencher” (Perry *et al.*, 2007).

Figura 2.2 Esquema das tecnologias SYBR® Green e TaqMan™ durante ensaios de qPCR.

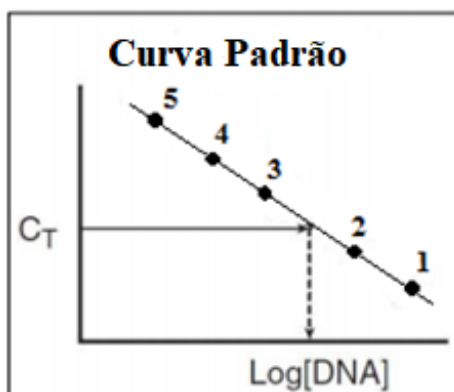


Fonte: Adaptado de (Cao *et al.*, 2020).

Para determinar o número exato de moléculas, é construída uma curva padrão, composta por alíquotas de concentrações conhecidas do alvo molecular em análise. Os valores

de C_T ou C_q são graficados contra o logaritmo da concentração do DNA (Figura 2.3) (Pelt-verkuil *et al.*, 2008). A amplificação e detecção da curva padrão são realizadas simultaneamente à amplificação das amostras que se deseja quantificar.

Figura 2.3 Curva padrão genérica obtida por diferentes amostras de concentrações conhecidas de DNA (1, 2, 3, 4 e 5).



Fonte: Adaptado de Butler, (John Butler, 2005)

Ensaio moleculares, como a PCR, têm sido amplamente utilizados na detecção de microrganismos patogênicos e deteriorantes veiculados por alimentos (Silva *et al.*, 2020; Xian *et al.*, 2023; Zheng *et al.*, 2020). No entanto, esse método apresenta algumas desvantagens, sendo a principal a impossibilidade de diferenciar células viáveis de células não viáveis. Consequentemente, a contagem de células viáveis pode ser superestimada ou apresentar resultados falso-positivos, pois o DNA pode persistir na amostra mesmo após a morte celular e ser amplificado na reação (Fittipaldi; Nocker; Codony, 2012).

Para superar a limitação da diferenciação entre células viáveis e não viáveis, o pré-tratamento de amostras com corantes intercalantes de DNA tem sido proposto como uma abordagem promissora. Essa estratégia se baseia na integridade das membranas celulares para distinguir entre os tipos celulares (Nocker; Cheung; Camper, 2006). Os corantes intercalantes de DNA mais utilizados para esse fim são o monoazida de etídio (EMA) e o monoazida de propídio (PMA), que apresentam mecanismos de ação semelhantes.

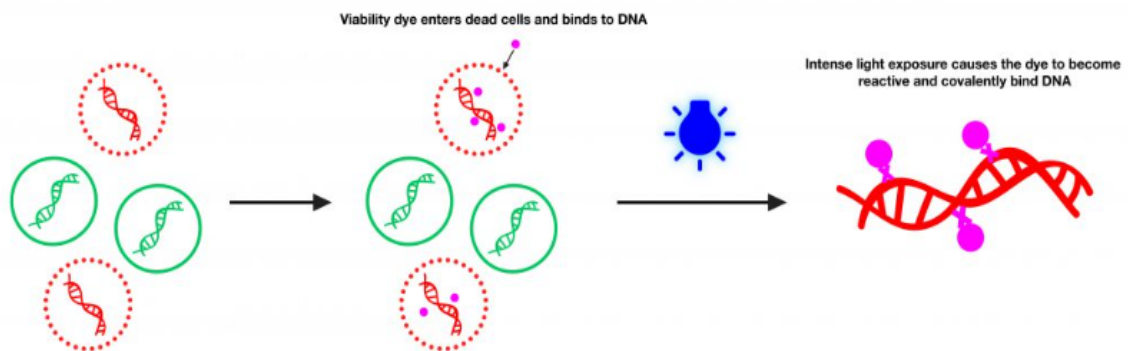
2.7.1.1 PMA-qPCR

Entre os métodos mais utilizados para diferenciar células viáveis de células não viáveis estão a coloração citológica diferencial e a contagem microscópica. Esses métodos se baseiam

no princípio de que a diferenciação é realizada com base na integridade da membrana celular (Cunningham; O’Byrne; Oliver, 2009).

Diversos corantes distintos podem se ligar a bases de DNA e RNA, como os derivados de azida (Telli; Doğruer, 2019). Entre esses corantes, o monoazida de propídio (PMA) destaca-se por sua capacidade de penetrar em células não viáveis (com membranas comprometidas), levando à perda da amplificação do sinal (Figura 2.4). Dessa maneira, o corante PMA permite a diferenciação seletiva entre células viáveis e não viáveis (Nocker; Cheung; Camper, 2006).

Figura 2.7.2 Esquema do princípio do tratamento utilizando o corante PMA para quantificação de células viáveis de bactérias usando qPCR.



Fonte Biotium (folheto de informações do produto)
disponível em <https://biotium.com/technology/microbiology/pma-for-viability-pcr/>

Corantes de qPCR de viabilidade, como PMAxx™ ou PMA, possuem permeabilidade limitada à membrana, tornando-os específicos para células mortas. Após penetrarem em uma célula morta, esses corantes se ligam ao DNA presente na célula. A exposição à luz visível intensa ativa os corantes, levando-os a se ligarem covalentemente ao DNA. Essa modificação do DNA impede sua amplificação em reações de PCR subsequentes (Nocker; Cheung; Camper, 2006).

Ensaio de PMA-qPCR foram desenvolvidos com bons resultados para a quantificação da viabilidade celular de BAL e de *Salmonella* spp. em alimentos (Beterams *et al.*, 2023; Rizzotti *et al.*, 2015). Apesar de promissor, o uso desse método para quantificar BAL deteriorantes e *Salmonella* spp. em crescimento misto em produtos cárneos ainda é pouco explorado na literatura.

2.8 MODELAGEM PREDITIVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

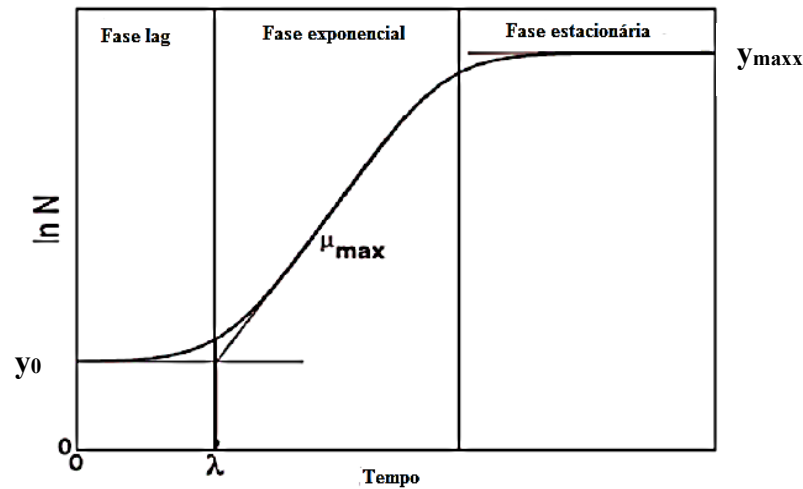
A microbiologia preditiva se caracteriza como uma ferramenta que implementa modelos matemáticos para descrever o comportamento das populações microbianas sob a influência de complexas alterações físicas, químicas e biológicas durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento de alimentos. Nesse contexto, modelos matemáticos são construídos com base em estudos quantitativos dos microrganismos em condições experimentais específicas, permitindo a geração de curvas de crescimento ou inativação microbiana (Huang, 2014).

Os diversos modelos de microbiologia preditiva fornecem respostas a perguntas cruciais para a indústria de alimentos e avaliadores de risco, como: qual o potencial de crescimento microbiano durante o resfriamento? qual a efetividade do processo de pasteurização? qual a dose final de patógenos a que os consumidores estão expostos? (Guillier, 2016). Nesse contexto, a Portaria nº 74 de 7 de maio de 2019 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2019) reconhece a microbiologia preditiva como ferramenta valiosa para a definição de variações de temperatura seguras no ambiente de corte e manipulação de carnes.

A microbiologia preditiva tem o potencial de se tornar uma ferramenta ainda mais crucial para garantir a segurança microbiológica dos alimentos. O desenvolvimento de modelos mais precisos pode ser impulsionado por avanços em métodos analíticos, facilitando a caracterização rápida de microrganismos e a coleta de conjuntos de dados abrangentes. Entre os progressos recentes, destacam-se o uso de modelos biologicamente interpretáveis que consideram novos parâmetros ambientais, a incorporação da interação microbiana em alimentos, a introdução de métodos analíticos inovadores e a aplicação de técnicas moleculares para caracterizar a variabilidade genética entre espécies microbianas (Akkermans *et al.*, 2016; Mejlholm; Dalgaard, 2015; Quinto; Marín; Schaffner, 2016; Silva *et al.*, 2020).

Os modelos preditivos de crescimento avaliam parâmetros cinéticos, como a concentração microbiana inicial (y_0), a duração da fase lag (λ), a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e a concentração celular máxima ($y_{m\acute{a}x}$) (Figura 2.5).

Figura 2.4 Curva característica do crescimento microbiano em função do tempo.



Fonte: Adaptado de Swinnen *et al.* (2004).

A fase lag (λ) caracteriza o período de adaptação do microrganismo ao novo ambiente, podendo durar de horas a dias. Essa etapa pode ser influenciada por diversos fatores, como o fenótipo da bactéria, o tamanho do inóculo, o estado fisiológico da população, a temperatura, o pH, a atividade de água e a disponibilidade de nutrientes (Rodriguez De Massaguer, 2006; McMeekin; Ross, 2002).

A fase exponencial marca o ápice da atividade metabólica do microrganismo. Nessa fase, a duplicação celular ocorre de forma constante, impulsionando um crescimento exponencial em função do tempo. A representação gráfica dessa fase em um gráfico semi-logarítmico evidencia uma linha reta cuja inclinação corresponde ao $\mu_{\max}$. A determinação da população máxima de crescimento ($y_{\max}$) se dá durante a fase estacionária, quando a velocidade de crescimento se equilibra com a velocidade de morte, estabilizando o tamanho da população (Rodriguez De Massaguer, 2006).

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

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

Na Equação 2.1, $y(t)$ representa a contagem da população no instante t , enquanto $\mu(t)$ simboliza a velocidade específica de crescimento dessa população. Essa velocidade é influenciada por diversos fatores, incluindo as condições ambientais a que a população está submetida e características intrínsecas à própria população (Longhi, 2012)

Em 1993, Whiting e Buchanan propuseram uma classificação para modelos de microbiologia preditiva, dividindo-os em três categorias: primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem o comportamento do microrganismo em função do tempo, considerando um conjunto fixo de condições. Já os modelos secundários analisam a sensibilidade dos parâmetros do modelo primário a alterações nas condições ambientais, como a temperatura. Por fim, os modelos terciários integram os modelos primários e secundários, visando gerar previsões para condições ambientais variáveis. Estes modelos terciários geralmente se apresentam na forma de *softwares* (Buchanan, 1993).

No âmbito da microbiologia preditiva, diversos modelos primários de crescimento foram desenvolvidos e descritos. Entre eles, o modelo de Baranyi e Roberts (1994) (BAR) se destaca por sua ampla utilização e pela capacidade de fornecer parâmetros com interpretação biológica (Smith-Simpson et al., 2007; Van Impe *et al.*, 2005). Esse modelo introduz o conceito de estado fisiológico das células, representado pelo parâmetro h_0 (Baranyi; Roberts, 1994; Ferrer *et al.*, 2009). O parâmetro h_0 resulta da multiplicação da fase lag (λ) pela velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$). Estudos indicam que h_0 está relacionado tanto às condições de incubação quanto às condições de crescimento às quais o microrganismo será submetido (Augustin; Rosso; Carlier, 2000; Fernando *et al.*, 2002; Swinnen *et al.*, 2004).

O modelo de BAR tem sido bastante utilizado para descrever o crescimento de bactérias deteriorantes e de bactérias patogênicas, como a *Salmonella* spp., em produtos cárneos sob diferentes temperaturas de armazenamento (Juneja *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2020; Menezes *et al.*, 2018; Milkiewicz *et al.*, 2020).

Modelos secundários assumem um papel crucial na microbiologia preditiva, pois elucidam a influência de fatores extrínsecos e intrínsecos, como temperatura, pH e atividade de água, entre outros, sobre os parâmetros cinéticos dos modelos primários (Huang; Hwang; Phillips, 2011; McMeekin; Ross, 2002). A compreensão dos fatores ambientais que impactam o comportamento microbiano é fundamental para o desenvolvimento de modelos primários robustos e para a aplicação eficaz de modelos secundários. Entre esses fatores, a temperatura se destaca por sua relevância, pois os parâmetros $\mu_{m\acute{a}x}$ e λ do modelo primário apresentam forte dependência da temperatura (Giannuzzi; Pinotti; Zaritzky, 1998). Qualquer equação que apresente uma boa descrição da relação entre os parâmetros do modelo primário e a temperatura pode ser utilizada como modelo secundário (Longhi, 2012).

Capítulo 3

3 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE CONTAGEM DE PLACAS E PMA-QPCR PARA MODELAR O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM PRESUNTO DE PERU DEFUMADO

No capítulo 3, um estudo comparativo entre os métodos de contagem em placa e PMA-qPCR, que geram dados para a modelagem matemática, foi realizado para descrever o crescimento de *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em presunto de peru defumado e embalado a vácuo armazenado em diferentes temperaturas (8, 10, 12, 16 e 20 °C).

Os dados deste capítulo foram publicados no periódico internacional *Food Control* (Qualis CAPES A1) em 2024 como manuscrito científico intitulado “*Comparative assessment of plate count and PMA-qPCR methods for modeling the growth of lactic acid bacteria in smoked turkey ham*” (DOI: [10.1016/j.foodcont.2024.110857](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110857)), e está apresentado a seguir.



Abstract

This study compared the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method combined with propidium monoazide (PMA) and the plate count (PC) method, both combined with predictive modeling, to describe the behavior of lactic acid bacteria (LAB) in vacuum-packaged sliced smoked turkey ham (STH). The PMA-qPCR method does not allow the DNA amplification of died cells but allow the amplification of viable cells, including the non-culturable. The standard curves relating quantification cycle (C_q) and $\log_{10}$ CFU/g demonstrated good linearity ($R^2 > 0.95$), evidencing its accuracy and reproducibility. These curves were used to quantify *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella viridescens* in artificially inoculated STH samples stored at different isothermal temperatures (8, 10, 12, 16 and 20 °C). Firstly, the PMA-qPCR and PC methods were compared, and the analysis demonstrated a good correlation ($R^2 = 0.99$) and agreement between the results. However, the PC method underestimated the quantification of *W. viridescens* cells by 0.76 $\log_{10}$ CFU/g at 8 °C, suggesting bacterial stress at this temperature, which was not observed for *L. mesenteroides*. In terms of growth, the maximum specific growth rate increased with rising temperature for both LAB. Predictive modeling indicated that the growth of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* at 8 °C suggests a shelf life of approximately 4.25 days for STH based on PC data, and 4.13 days based on PMA-qPCR data. In conclusion, the PMA-qPCR method presented an advantage in terms of accuracy, especially under bacterial stress conditions, and proved to be a promising alternative for the quantification of LAB in refrigerated ready-to-eat meat products. The predictive models used were suitable for describing microbial growth, reinforcing the importance of the PMA-qPCR method in shelf life and food safety studies.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*. Microbial growth. Molecular method. Predictive modeling. Ready-to-eat product. *Weissella viridescens*.

3.1 INTRODUCTION

Turkey meat production has stood out among meat products in the Brazilian market, with a production of 133.3 thousand tons in 2023 and export of 69.8 thousand tons, according to ABPA (2024). The increase in demand for ready-to-eat (RTE) meat products reflects changes in contemporary lifestyles, driving the pursuit of convenience and speed in eating (Elmas et al., 2021). Additionally, there is growing development of poultry-based meat products (Melro et al., 2020), such as turkey breast ham, also known as “turkey ham” (Feiner, 2006). Turkey ham is a processed product that can be made from the breast or thigh of the bird, and like other processed meat products, its quality depends on the quality of the raw material and the production method (Feiner, 2006; Iqbal et al., 2010).

Microbial growth is the main factor in the spoilage of meat and meat products (Ji et al., 2021), even when stored under refrigeration, making them inadequate for consumption (Marmion et al., 2021; Nychas et al., 2008; Saenz-Garcia et al., 2020). This spoilage process is linked to spoilage bacteria, such as lactic acid bacteria (LAB), particularly the species *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella viridescens* (formerly *Lactobacillus viridescens*) (Collins et al., 1993). These bacteria can cause acidification, green discoloration, off-flavors, and slime formation in meats and meat products (Nieminen et al., 2011; Pothakos et al., 2015). The mentioned species have been highlighted as the main problems behind the spoilage of cooked meat products (Comi & Iacumin, 2012; Comi et al., 2016; Dušková, Kameník, & Karpíšková, 2013; Iacumin et al., 2014; Martins & Feiten, 2023; Pellissery et al., 2020; Zhang et al., 2012).

Numerous studies have reported spoilage caused by *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in beef, pork, poultry and cured or cooked meats (Bouju-Albert, Pilet, & Guillou, 2018; Iacumin et al., 2014; Zhang et al., 2012; Zurera-Cosano et al., 2005). Additionally, some authors report that the genus *Leuconostoc*, along with other LAB species, is particularly prevalent in vacuum-packaged cooked meat products due to the combined effects of pH, water activity, brine salinity, and smoke (Comi & Iacumin, 2012; Samelis, Kakouri, & Rementzis, 2000). This highlights the need to describe the behavior of spoilage LAB in vacuum-packaged smoked turkey ham.

The evaluation of the shelf life of meat and meat products, based on LAB growth, using conventional microbiological methods, such as plate count, presents several limitations, including low reproducibility and laborious and time-consuming operating procedures (Schillinger, Holzappel, & Björkroth, 2006). As an alternative, predictive microbiology offers

an approach that uses mathematical models to predict bacterial growth based on intrinsic and extrinsic factors such as temperature, pH, and water activity (McMeekin et al., 1987; Ross, 1999). The use of predictive microbiology has become a widely recognized and essential tool for evaluating and managing food safety and/or shelf life studies of RTE products (Allende et al., 2022; Messens, Hempen, & Koutsoumanis, 2018; Torres-Baix et al., 2023). Significant studies on cooked meat product matrices at different temperatures have been conducted to generate predictive models for LAB (Dalcanton et al., 2013; Li et al., 2013; Menezes et al., 2018; Silva et al., 2017). However, the use of the plate count method in constructing these models can lead to the underestimation of stressed, fastidious, or viable but non-culturable (VBNC) bacteria (Liao et al., 2015; Ramamurthy et al., 2014; Su, Jane, & Wong, 2013; Zhang et al., 2015).

DNA-based techniques such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR) have gained prominence for their high specificity and sensitivity. However, Liao et al. (2015) compared qPCR and plate count methods to evaluate the behavior of *Vibrio parahaemolyticus* at 10 °C. Their study revealed that, although the plate count method showed a decline in bacterial growth, qPCR detected a continuous increase, suggesting that qPCR might be detecting either bacteria in a viable but non-culturable (VBNC) state or residual DNA from dead cells. The authors suggest the use of dead cell inhibitors, such as propidium monoazide (PMA), combined with qPCR to obtain a more accurate estimate of the viable microbial population.

PMA combined with qPCR (PMA-qPCR) has been proposed as an effective method to prevent the amplification of DNA from dead cells (Liu & Mustapha, 2014). However, there have been no investigations into modeling the growth of spoilage LAB in RTE smoked meat products using a molecular method capable of inhibiting the amplification of DNA from nonviable cells. In this study, we modeled the growth of two LAB species in monoculture, *L. mesenteroides* and *W. viridescens*, in sliced, vacuum-packaged smoked turkey ham under different refrigerated storage conditions (8 °C and 10 °C) and inadequate storage conditions (12, 16, and 20 °C). To achieve this goal, we used two analytical methods: plate count, a culture-based method, and the PMA-qPCR, to obtain a more precise assessment of changes in bacterial counts of RTE refrigerated meat products and, consequently, its shelf life.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Microorganisms and inoculum preparation

Ten different strains of two species of LAB were used in this study. These included two reference strains, *L. mesenteroides* ATCC 8293™ and *W. viridescens* ATCC 12706™, as well as six strains isolated from blood sausage by Diez et al. (2009): *L. mesenteroides* L₁, L₈, and L₃₅, and *W. viridescens* W₁, W₈, and W₃₅. Additionally, two other strains, *L. mesenteroides* 66 and *W. viridescens* 132, were isolated from blood sausage by Santos et al. (2005). The LAB strains were cultured in De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 30 °C for 24 h. The suspensions were individually stored frozen at -80 °C in MRS broth supplemented with 30% glycerol for strain cryopreservation.

The preparation of the inocula followed the methodology described by Martins et al. (2024). For each species, 100 µL of suspensions (5 strains of *W. viridescens* and 5 strains of *L. mesenteroides*) were thawed and transferred to tubes containing 10 mL of MRS broth. The suspensions were incubated at 30 °C for 24 h and subcultured the next day. The subculture was grown for 18 h until reaching the stationary growth phase, obtaining a concentration of approximately 1×10^9 CFU/mL, according to previous studies (Silva et al., 2018; Martins et al., 2020). Two separate cocktails were prepared, one for each species, by combining equal parts of the standardized suspensions to produce a mixture containing approximately 1×10^8 CFU/mL of *L. mesenteroides* and approximately 1×10^8 CFU/mL of *W. viridescens*.

3.2.2 Sample characterization and preparation

In this study, whole pieces of smoked turkey ham were purchased from a local store in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. To ensure optimal freshness, only pieces with a production date of less than 15 days were selected.

After opening the packaging, the pH, water activity (a_w), and chloride concentration (converted to sodium chloride, NaCl) of the smoked turkey ham samples were evaluated. For the determination of a_w , 3.5 g of shredded smoked turkey ham was used. Measurements were performed using an a_w meter (Aqualab, SERIES 3T3 model). The pH was assessed in triplicate by measuring at three equidistant points within the smoked turkey ham samples, using a pH meter specifically designed for solid foods (Texto, model 205).

The NaCl concentration was calculated from chloride analysis using the method described by Aliño et al. (2011). Approximately 4 g of the samples was ground with distilled water and homogenized using a digital Ultra Turrax (IKA, T25) at 20,000 rpm for 1 min. The resulting homogenate was transferred to a volumetric flask and diluted to a final volume of 100 mL with distilled water. The solution was then centrifuged (Sigma, 4k15) at 9,000 rpm for 10 min. A 0.5 mL aliquot of the supernatant was collected and analyzed using a chloride analyzer (Cole Parmer, 926). The results were expressed in milligrams of Cl per liter of solution, with the instrument providing a resolution of 1 mg/L. Using this value, the NaCl concentrations in the samples were calculated according to Eq. (3.1).

$$X_{NaCl} = \left(\frac{L \times V}{m} \right) \times \left(\frac{M_{NaCl}}{M_{Cl}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

Where X_{NaCl} = sodium chloride concentration (g NaCl/100 g), L = equipment reading (g Cl/L of solution), V = volume in liters of solution (samples + distilled water), m = sample mass (g), M_{NaCl} = molar mass of sodium chloride (58.44 g/mol) and M_{Cl} = molar mass of chloride (35.45 g/mol).

The surfaces of the pieces were treated with 70% ethanol to eliminate the natural microbiota, as described by Menezes et al. (2018). The pieces were then aseptically sliced in a laminar flow hood using a cold-cut slicer (Metvisa, CFIE 250) set to a thickness of 1.5 mm. The slicer and the utensils used in the process were previously sanitized with 70% ethanol and exposed to ultraviolet light for approximately 30 min.

3.2.3 Artificial inoculation of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in smoked turkey ham slices and storage conditions

The experiments were conducted in monoculture for each LAB. Slices of smoked turkey ham samples (STH), with a mean weight of 14 g, were artificially inoculated with 100 µL of each LAB cocktail separately, containing approximately 1×10^6 CFU/mL. This resulted in an initial concentration of approximately 1×10^3 CFU/g in the samples for both *L. mesenteroides* and *W. viridescens*. The inoculum was then spread over the entire slice using a disposable sterile loop until it was fully absorbed by the STH sample. For vacuum-packaged turkey ham slices without inoculum (negative control), 100 µL of sterile water was added (these

samples were used in PMA-qPCR reactions as a negative control). The slices were then sequentially placed in DNase/RNase-free bags (primary packaging) and vacuum-packed (secondary packaging).

The samples were inoculated isothermally at temperatures of 8, 10, 12, 16, and 20 °C to evaluate the influence of temperature on the cold chain of vacuum-packaged meat products. The choice of the storage temperature range (8 °C to 20 °C) in this study was deliberate and based on scientific literature and common cold chain practices, from transportation to storage in domestic refrigerators (Ndraha et al., 2018; Garrido et al., 2010; Brenes et al., 2020). The temperature inside the refrigerated environment was recorded by a Testo mini data logger (model 174H, Testo AG, Lenzkirch, Germany).

3.2.4 Quantification of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in STH

All artificially inoculated STH samples were analyzed on different days, according to the temperatures applied in each experiment during the incubation period. For each temperature studied, two experiments were conducted on different days. Sterile homogenization bags (DNase/RNase-free) containing STH were filled with peptone water (1%, w/v) at a ratio 9:1 [volume peptone water (mL): STH mass (g)]. The suspension was then agitated in a Stomacher (ITR model 1204) for 1 min to perform the initial dilution (10^{-1}). From this dilution, microbial growth curves were established in duplicate (each slice used was obtained from different turkey ham pieces), using plate count (PC) and PMA-qPCR methods, up to the stationary growth phase.

For the PMA-qPCR method, the 10^{-1} dilution of the STH suspension was immediately treated with PMAxx™, centrifuged, and the pellets were resuspended in 500 µL of milli-Q water in the same tube (see section 2.4.2.1), and subsequently frozen until used for DNA extraction.

3.2.5 Growth curves by plate count (PC)

The plate count method followed the guidelines of the International Organization for Standardization (ISO 15214:1998). Quantifications were carried out in duplicate by surface plating on MRS agar (Difco™, Detroit, USA), with the plates incubated at 30 °C for 72 h. The

average CFU/g count from two independent samples at each point in the growth curve was calculated to determine the growth kinetics.

3.2.6 Growth curves by PMA-qPCR

3.2.6.1 Pre-treatment with PMAxx™

According to the manufacturer's recommendations, 100 µL of PMAxx™, an improved version of PMA (Biotium Inc., Fremont, CA, USA), was diluted in 900 µL of ultrapure water to form a 20 mM stock solution (stored at -20 °C in a dark environment). An appropriate volume of PMAxx™ stock solution was added to a 2 mL tube containing 500 µL of cell suspension to yield a final PMAxx™ concentration of 25 µM. The volume of cell suspension was used based on the study conducted by Miotto et al. (2020). To preserve the ability of PMAxx™ to be activated by light, all experiments were conducted in a dark environment. After the addition of PMAxx™, the tubes were incubated in the dark at room temperature for 10 min with intermittent agitation. Next, they were exposed to light-emitting diode (LED) using the PMA Lite™ LED Photolysis Devices (Biotium Inc., Fremont, CA, USA) for 15 min, with agitation every 5 min. Subsequently, the samples treated with PMAxx™ were centrifuged at $6000 \times g$ for 10 min at room temperature, and the supernatant was discarded. The pellets were resuspended in 500 µL of milli-Q water in the same tube and stored at -80 °C until DNA extraction.

3.2.6.2 Genomic DNA extraction

Genomic DNA of LAB in the STH samples was extracted in duplicate from PMAxx™ treated suspensions. After centrifugation at $6000 \times g$ for 10 min, the genomic DNA was isolated using the DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen, United Kingdom), according to the manufacturer's instructions.

3.2.6.3 PMA-qPCR assay conditions

PMA-qPCR reactions were performed on the QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the *FastStart™ Universal Probe Master* (ROX) kit (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

Cycling conditions for identifying and quantifying *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in STH were carried out as described by Elizaquível, Chenoll, & Aznar (2008) and Gómez-Rojo et al. (2015), respectively. Both experiments used TaqMan™ qPCR primers and probes for PMA-qPCR amplifications, as detailed in Table 1. Amplification reactions were conducted in triplicate for both species, with a final volume of 20 µL. The amplification reactions were performed in triplicate with a final volume of 20 µL. For *L. mesenteroides*, the reaction mixture contained 10 µL of 1× FastStart™ Universal Probe Master (ROX) (Sigma-Aldrich, Brazil), 0.20 µL of each primer, 0.20 µL of TaqMan™ probe, 2 µL of DNA, and 7.40 µL of milli-Q water to complete the reaction volume. For *W. viridescens*, the reaction consisted of 10 µL of 1× FastStart™ Universal Probe Master (ROX), 0.60 µL of each primer, 0.35 µL of TaqMan™ probe, 2 µL of DNA, and 6.45 µL of milli-Q water to complete the total volume. The cycling conditions for *L. mesenteroides* were an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles consisting of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C, with a final extension at 72 °C for 5 min. For *W. viridescens*: an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles consisting of 60 s at 95 °C and 30 s at 64 °C, with a final extension at 72 °C for 10 min.

Table 3.1 Oligonucleotide primers and probes used in PMA-qPCR amplifications.

Species	Gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Position	Amplicon size (pb)	Reference
<i>L. mesenteroides</i>	<i>23S rRNA</i>	LMF	CCA GTT GTA ATG CGT TAT TAC C	1956	130	Elizaquível; Chenoll; Aznar, (2008)
		LMR	CAC AGC TTG TCC TTA TAG AAA A	2082		
		TaqMan probe	FAM-TTCACTCTTTTCAAGACTTACTG-MGB	2031		
<i>W. viridescens</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		
		TaqMan probe	FAM-CCGTGCCCTGACGTTAGCCA-BHQ1	930		

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

3.2.6.4 Standard curves by PMA-qPCR assays

Standard curves were created by correlating the average cycle quantification (C_q) values from four qPCR runs performed on independent days. For each experiment related to the standard curve, STH samples were used in duplicate, with DNA extraction performed separately for each replicate. The PMA-qPCR reactions were performed in triplicate for each replicate, totaling twelve PMA-qPCR reactions (six for each experiment). The $\log_{10}$ of the concentrations of *L. mesenteroides* or *W. viridescens*, expressed in CFU/g of inoculated STH, were determined for each growth curve, allowing for an accurate correlation with the standard. The C_q values were obtained from the DNA extracted from an experimental point in the stationary phase of each growth curve as described by Martins et al. (2024). To quantify the amount of genomic DNA, standard curves were prepared by serial dilution. Ten-fold serial dilutions were prepared from 1×10^1 to 1×10^9 CFU/g in milli-Q water. All qPCR runs were analyzed using the software's automatic settings. Uninoculated STH samples were analyzed as a negative control in triplicate.

The values for the limit of detection (LoD) and the limit of quantification (LoQ) were determined as described by Kubista et al. (2006). The amplification efficiencies of the standard curves were determined using Eq. (3.2), as described by Bustin et al. (2009).

$$E = [10^{(-1/S)} - 1] \times 100 \quad \text{Eq. (3.2)}$$

Where S represents the slope of the linear regression line, and E is the amplification efficiency.

3.2.6.5 Preparation of growth curves by PMA-qPCR

To quantify *L. mesenteroides* or *W. viridescens* in STH by PMA-qPCR, the standard curve equations were applied to correlate C_q values with $\log_{10}$ CFU/g values, resulting in a growth curve expressed as $\log_{10}$ CFU/g by PMA-qPCR. Several authors have reported using standard curves to correlate C_q values with $\log_{10}$ CFU/g in qPCR assays for generating LAB growth curves, including *L. mesenteroides* or *W. viridescens* (Martins et al., 2020; Martins et al., 2024; Severo, 2018).

3.2.6.6 Comparative analysis between methods

The comparison between the results obtained using PC and PMA-qPCR methods was carried out through correlation analysis (Passing & Bablok, 1983) with a 95% confidence interval (95% CI). The coefficients of determination (R^2) of the linear regressions were calculated. The limits of agreement between the two methods were evaluated based on the statistical approaches proposed by Bland & Altman (1986). The graphs were generated using the Microsoft® Excel® 365 software, version 2204 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3.2.7 Growth modeling

3.2.7.1 Primary models

The Baranyi & Roberts primary model, Eqs. (3.3), (3.4) and (3.5) (Baranyi & Roberts, 1994), was fitted to the experimental growth curves of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in STH obtained by PMA-qPCR and PC methods. Subsequently, the quality of the fits was compared (see section 2.6.4).

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} F(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{\exp^{\mu_{max} F(t)} - 1}{\exp^{y_{max} - y_0}} \right\} \quad (3.3)$$

$$F(t) = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln \left[\exp^{(-\mu_{max} t)} + \exp^{(-h_0)} - \exp^{(-\mu_{max} t - h_0)} \right] \quad (3.4)$$

$$h_0 = \mu_{max} \lambda \quad (3.5)$$

Where $y(t)$ is the logarithm of the microbial concentration [$y = \log_{10}(N(t))$] at time t (h). The parameter μ_{max} is the maximum specific growth rate (1/h); λ is the lag phase duration (h); y_0 is the logarithm of the initial microbial concentration [$y_0 = \log_{10}(N_0)$]; y_{max} is the logarithm of maximum population [$y_{max} = \log_{10}(N_{max})$]; h_0 is the parameter related to the

physiological state of cells (dimensionless); $F(t)$ is the Baranyi & Roberts model adjustment function.

3.2.7.2 Secondary models

The Exponential and Ratkowsky square root secondary models (Eqs. (3.6) and (3.7)), respectively were used to describe the effect of the temperature on the maximum specific growth rate (μ_{max}).

$$\mu_{max} = ae^{(bT)} \quad (3.6)$$

$$\sqrt{\mu_{max}} = c(T - T_{min}) \quad (3.7)$$

Where a (1/h), b (1/°C) and c [1/(°C $\sqrt{h}$)] are empirical parameters, T is the storage temperature (°C) and T_{min} is the theoretical minimum growth temperature (°C).

3.2.7.3 Numerical analysis

The fitting of primary model to experimental microbial growth data obtained by PMA-qPCR and PC methods, as well as the fitting of secondary models, was performed using Matlab R2017a software (MathWorks®, Natick, USA). Parameter estimation was carried out in two steps. In the first step, the y_0 parameter was fixed (experimental data of logarithm of the initial population) and the parameters were estimated by fitting the model to experimental data, calculating the arithmetic mean value of parameter h_0 for all temperatures. In the second step, this mean value of h_0 and y_0 were fixed, and parameters λ , μ_{max} , and y_{max} were estimated through a new fit for each temperature. This approach is supported by experimental observations from several studies (Amézquita et al., 2005; Baranyi & Roberts, 1994; Baranyi et al., 1995; McKellar et al., 2002; Pin et al., 2002), which show that h_0 can be considered the product of the maximum specific growth rate and the lag time. This relationship is not significantly affected by small variations in environmental conditions, particularly temperature. Therefore, h_0 tends to be approximately constant when the pre-inoculation history of the cells is similar.

The STH shelf life was defined as the period needed to reach a concentration of 1×10^7 CFU/g ($7 \log_{10}$ CFU/g), according to the model fit (EFSA, 2016; Menezes et al., 2018; Slongo et al., 2009).

3.2.7.4 Goodness-of-fit indexes of the primary and secondary models

Model performance was evaluated with the coefficient of determination (R^2), the Root-Mean-Square-Error ($RMSE$, $\log_{10}$ CFU/g), the Bias Factor (B_f), and the Accuracy Factor (A_f), calculated by Eqs. (3.8) to (3.11), respectively.

$$R^2 = \left\{ \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{obs})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs} - \bar{y})^2} \right] \right\} \quad (3.8)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_{pred} - y_{obs})^2}{n - p}} \quad (3.9)$$

$$B_f = 10^{\left[\frac{\sum \log(y_{pred}/y_{obs})}{n} \right]} \quad (3.10)$$

$$A_f = 10^{\left[\frac{\sum |\log(y_{pred}/y_{obs})|}{n} \right]} \quad (3.11)$$

Where n is the number of observations, p is the number of model parameters, y_{obs} , y_{pred} , and $\bar{y}$ are the observed values, predicted values, and average values, respectively. According to Ross (1996), the B_f value is a measure of average variation between the observed and predicted values, and the A_f value measures the average difference between the observed and the predicted values.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Smoked turkey ham characterization

The characterization of the smoked turkey ham samples was conducted in triplicate. The average values of pH, a_w , and NaCl concentration, along with their respective standard deviations (SD), were determined to be 6.18 (± 0.005), 0.98 (± 0.009), and 1.32% (± 0.005), respectively. Possas et al. (2017) investigated the centesimal composition of RTE turkey products and reported pH values ranging from 6.15 to 6.45, a_w between 0.97 and 0.98, and NaCl concentrations ranging from 1.3% to 2.5%. These results corroborate the findings of this study. Based on the analyses conducted, it can be concluded that the evaluated smoked turkey ham samples exhibit the expected characteristics for this type of product.

3.3.2 Standard curves for PMA-qPCR method

Figs. 3.1 and 3.2 show the C_q values in relation to cell concentration ($\log_{10}$ CFU/g) of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in STH, respectively, cultured at 8, 10, 12, 16 and 20 °C. All the standard curves for both LAB indicated a linear relationship over a range of 7 or 8 $\log_{10}$ CFU/g, in accordance with the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines (Bustin et al., 2009).

To ensure the reliability of the analyses, the standard curves were evaluated based on criteria established in the literature, including an R^2 value greater than 0.95 and a slope between -3.0 and -3.9, corresponding to PCR efficiencies between 80% and 115% (Pedrolo et al., 2024). The curves obtained in this study met these criteria, except for the slopes of the standard curves for *L. mesenteroides* at 8 °C (Fig. 3.1a) and *W. viridescens* at 16 °C (Fig. 3.2d), which showed values slightly below the lower limit. This variation was caused by the reduced C_q range at lower concentrations (Kralik & Ricchi, 2017). However, the high R^2 value obtained for these curves confirms that the linear relationship between C_q and cell concentration was maintained, reinforcing the reliability of the results.

Quantification was considered specific and sensitivity up to an average C_q value of 30.31 ± 1.21 for *L. mesenteroides* and 31.25 ± 1.21 for *W. viridescens*, corresponding to a LoD of 2 $\log_{10}$ CFU/g or 1×10^2 CFU/g using the PMA-qPCR method for both LAB across all evaluated temperatures. As noted by Berdal & Holst-Jensen (2001) and Papić et al. (2017), the

LoD is 5 to 10 times lower than the LoQ for complex samples. In the present study, the LoQ was 3 log₁₀ CFU/g for both LAB in STH, which is below the critical microbiological threshold for spoilage LAB in meat products, which is 7 log₁₀ or 1 × 10⁷ CFU/g. The LoD and LoQ values obtained in this work are comparable to those reported by other authors for the quantification of different LAB in various meat products, such as 2 log₁₀ CFU/g for LAB in vacuum-packaged beef (Dorn-In et al., 2023), 3 log₁₀ CFU/g for *W. viridescens* in blood sausage (Gómez-Rojo et al., 2015), and 3.5 log₁₀ CFU/g for *Latilactobacillus sakei* (formerly *Lactobacillus sakei*) in fermented sausage (Martín et al., 2006).

According to the standard curves, the PMA-qPCR method is suitable for detecting and quantifying *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in cooked and smoked meat products. However, it is necessary to evaluate the validity of these standard curves to measure the growth kinetics of these bacteria in STH, with the goal of establishing a predictive model. Therefore, the PMA-qPCR and PC methods were evaluated to quantify artificially inoculated spoilage LAB in STH, stored under different isothermal conditions.

Figure 3.1 Standard curve constructed by plotting the average C_q values for four PMA-qPCR runs for two independent amplifications against the logarithm of the cell concentration (CFU/g) (determined by PC) of *L. mesenteroides* in sliced vacuum-packaged smoked turkey

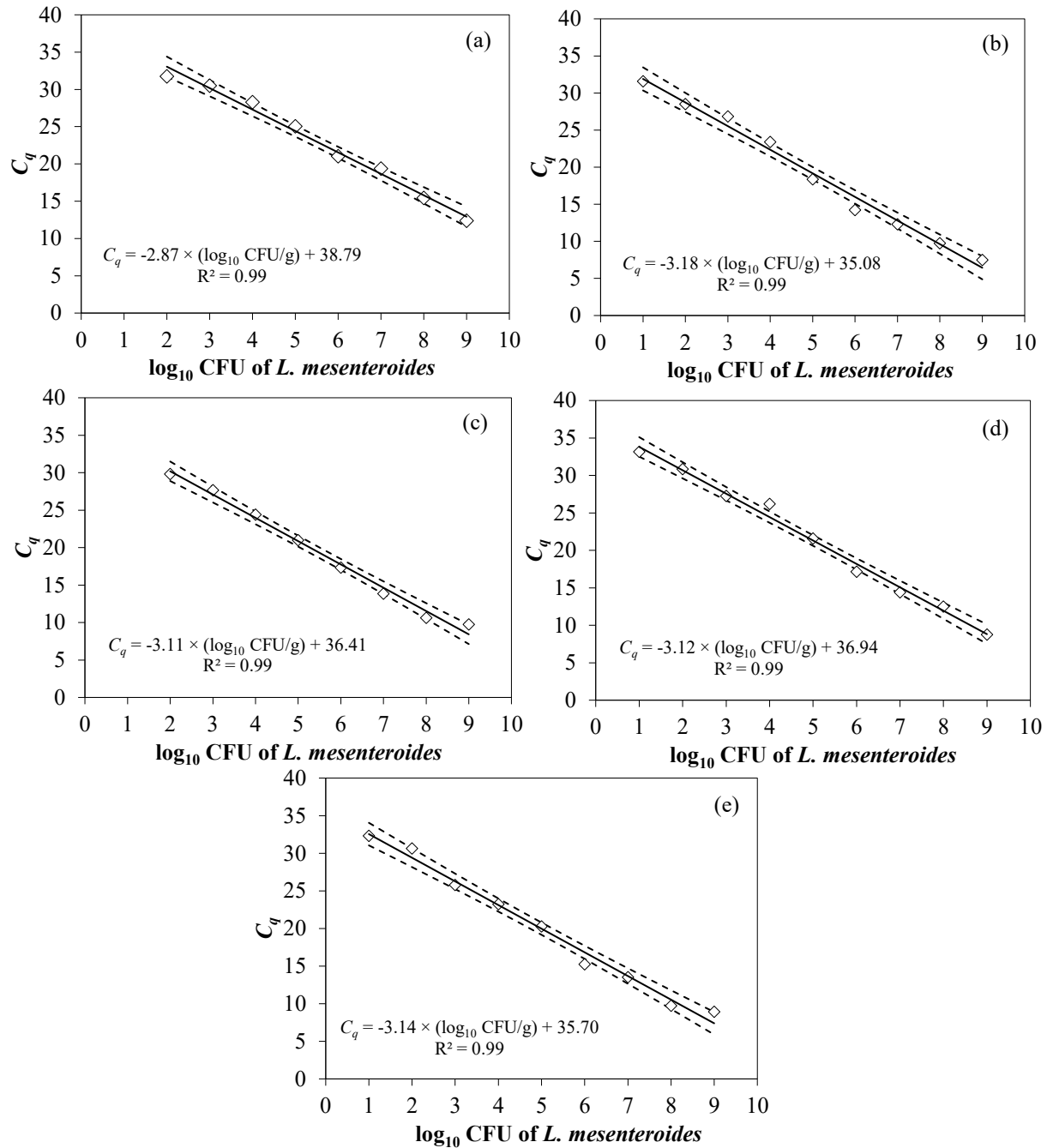
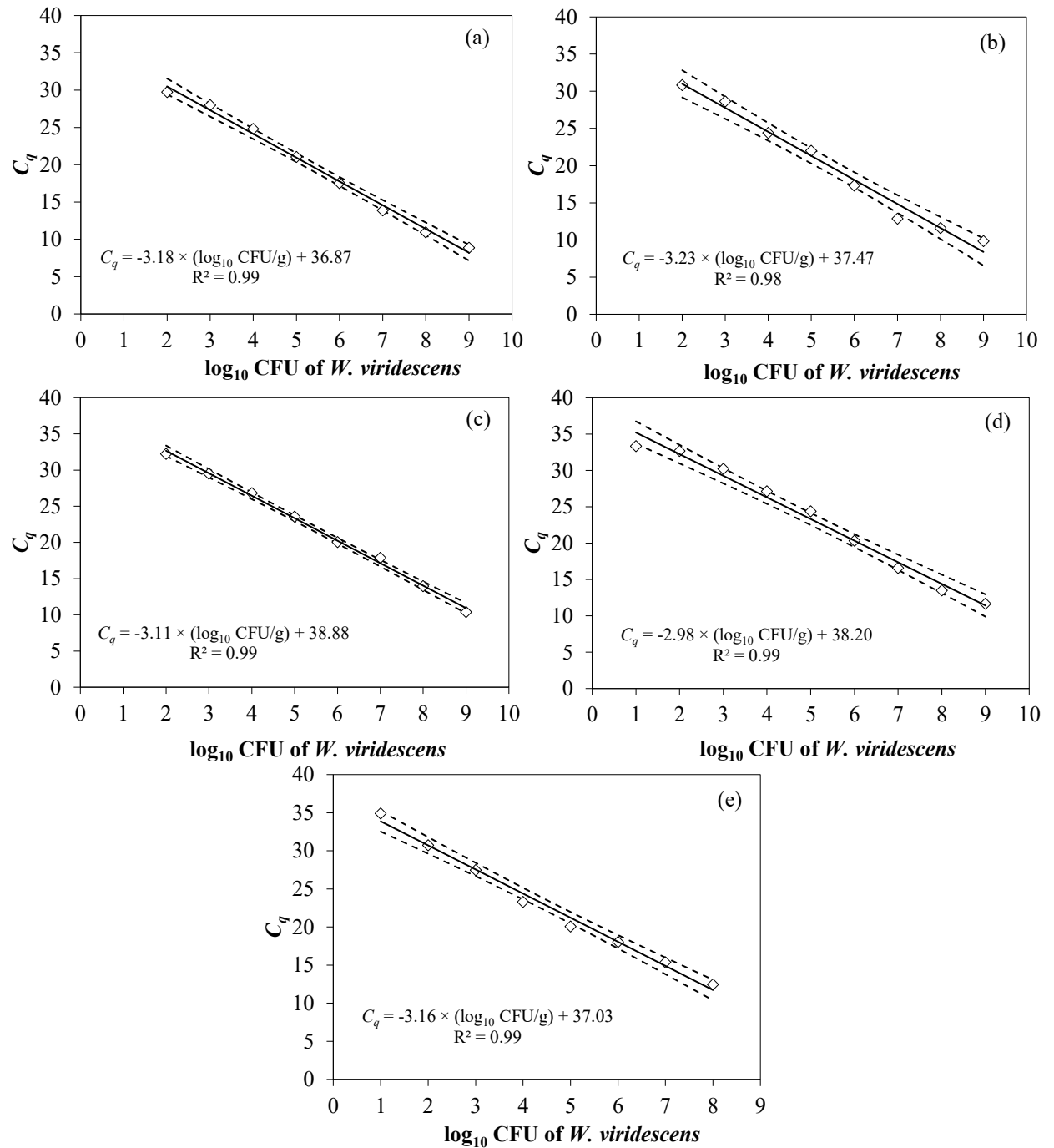


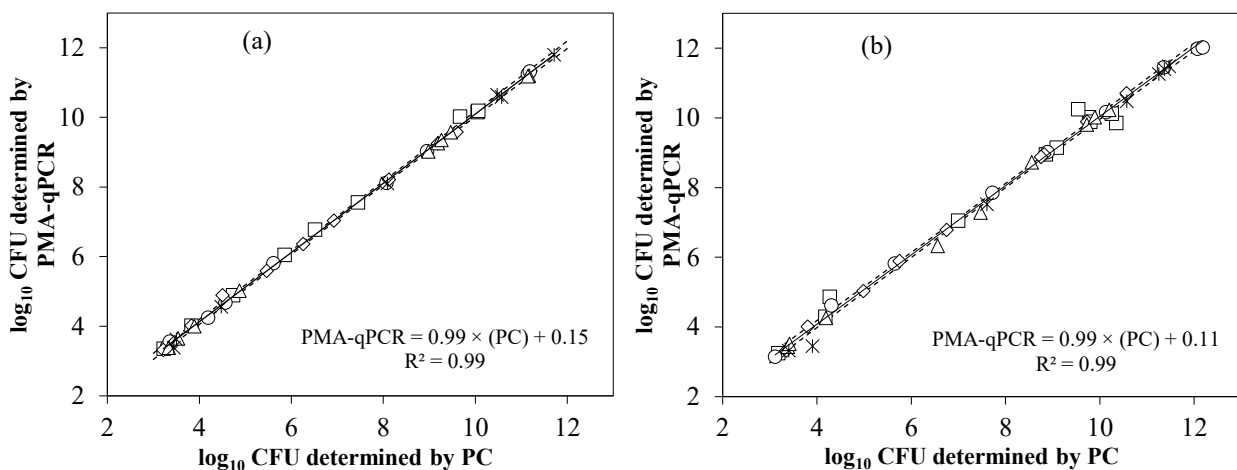
Figure 3.2 Standard curve constructed by plotting the average C_q values for four PMA-qPCR runs for two independent amplifications against the logarithm of the cell concentration (CFU/g) (determined by PC) of *W. viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham.



3.3.3 Comparison of growth data obtained by PMA-qPCR and PC methods

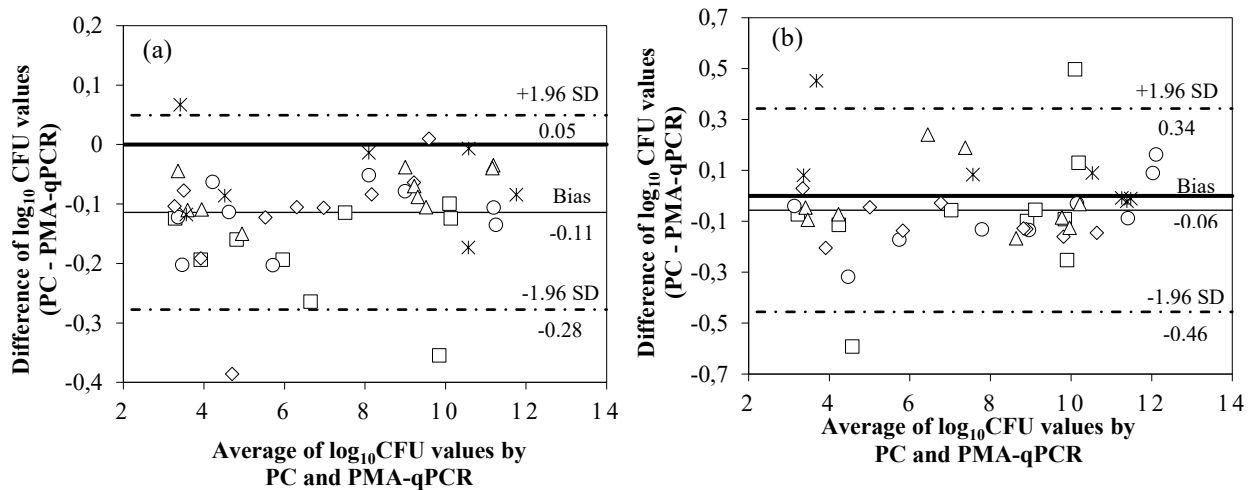
The correlation between the PC and PMA-qPCR methods was evaluated using regression analysis (95% CI), represented in Fig. 3.3. Linear regression analysis showed a statistically significant correlation between PC and PMA-qPCR for the enumeration of the *L. mesenteroides* ($R^2 = 0.99$; Fig. 3.3a) and *W. viridescens* ($R^2 = 0.99$; Fig. 3.3b) in monoculture at 8, 10, 12, 16 and 20 °C.

Figure 3.3 Linear regression analysis of LAB cells concentration ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PC against BAL cells concentration ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PMA-qPCR methods in STH stored at 8 °C ($\square$), 10 °C ($\circ$), 12 °C ($\diamond$), 16 °C ($\triangle$) and 20 °C ($\times$). Figure (a) *Leuconostoc mesenteroides* and Figure (b) *Weissella viridescens*. Dotted lines represent the 95% confidence interval, and solid lines represent the fit of linear equation (presented with coefficients of determination, R^2).



Bland-Altman plots (Fig. 3.4) were used to evaluate the agreement between the methods. The upper and lower horizontal lines represent the 95% limits of the agreement. The limits for *L. mesenteroides* ranged from -0.28 to 0.05 $\log_{10}$ CFU/g (Fig. 3.4a), while for *W. viridescens*, the limits ranged from -0.46 to 0.34 $\log_{10}$ CFU/g (Fig. 3.4b). These results indicate that 95% of the pairs of enumeration results for *L. mesenteroides* and *W. viridescens* differed by less than 0.28 and 0.46 $\log_{10}$ CFU/g, respectively. This suggests that the PC method generally yielded lower values compared to the PMA-qPCR method [$\log_{10}$ CFU/g (PC – PMA-qPCR)]. A possible hypothesis for these results is that the PC method does not account for the enumeration of cells in the VBNC state and under stress. To evaluate this underestimation, Bland-Altman plots were highlighted for the temperature of 8 °C, considered the most challenging condition for the growth of LAB in this study (Fig. 3.5).

Figure 3.3.1 Bland-Altman analysis of agreement of cell concentration values ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PC and cell concentration obtained by PMA-qPCR methods in STH stored at 8 °C ($\square$), 10 °C ($\circ$), 12 °C ($\diamond$), 16 °C ($\triangle$) and 20 °C ($\times$). Figure (a) *Leuconostoc mesenteroides* and Figure (b) *Weissella viridescens*. The thin solid line represents the Bias (mean), while the standard deviations from the average difference of $\log_{10}$ are represented as dashed lines. The solid bold line represents the zero line. SD: standard deviation.

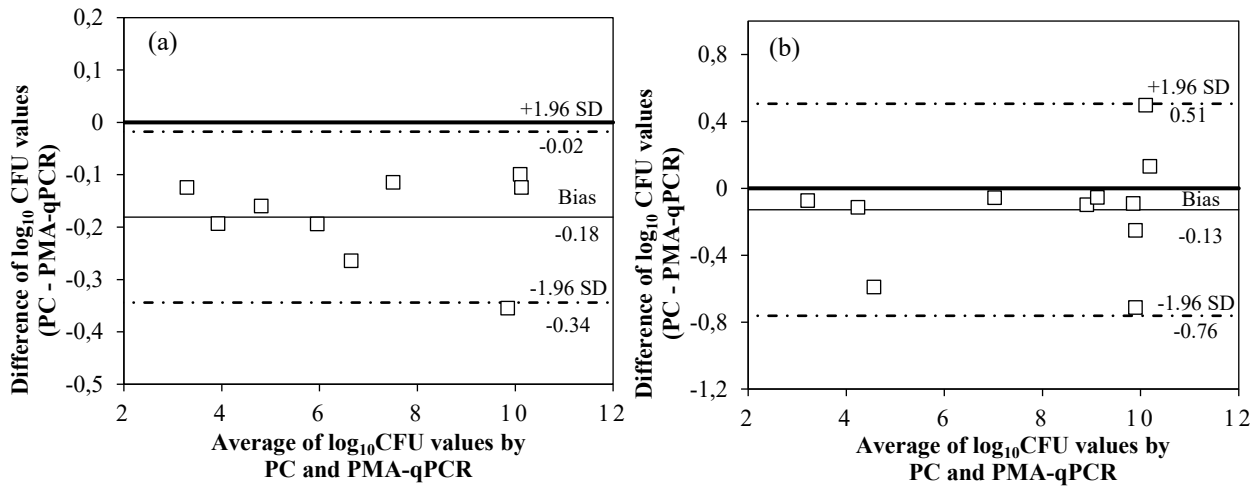


A more pronounced underestimation of the PC method was observed for the growth of *W. viridescens* at 8 °C (0.76 $\log_{10}$ CFU/g) (Fig. 3.5b), in contrast to *L. mesenteroides*, which showed a difference of 0.34 $\log_{10}$ CFU/g (Fig. 3.5a), similar to the values at other temperatures. A hypothesis for this discrepancy lies in the stress induced by low temperatures in *W. viridescens*, which possibly hinders the enumeration of cells under this condition. In contrast, *L. mesenteroides* demonstrates optimal adaptability to refrigeration temperatures. Supporting this hypothesis, Vermeiren et al. (2005) reported lower growth of *W. viridescens* compared to *L. mesenteroides* in cooked ham stored at 7 °C, using PC method in pure culture. More recently, Martins et al. (2024) observed slower growth of *W. viridescens* compared to *L. mesenteroides* in co-culture at 8 °C in MRS broth, determined by SYBR® Green qPCR. Thus, our findings suggest that the PMA-qPCR method can be used to describe the growth of these LAB, particularly at low temperatures.

Regarding the mean of the differences between concentrations [$\log_{10}$ CFU/g (PC – PMA-qPCR); Bias value], a Bias of -0.11 for *L. mesenteroides* and -0.06 for *W. viridescens* indicates a trend of agreement when comparing PC and PMA-qPCR (difference = 0; Fig. 3.4). These values are lower than accepted error value of 0.5 to 0.8 $\log_{10}$ for plate counts in solid matrices (AFSSA, 2008).

Figure 3.2 Bland-Altman analysis of agreement of cell concentration values ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PC and cell concentration obtained by PMA-qPCR methods in STH, highlighted to storage at 8 °C. Figure (a)

Leuconostoc mesenteroides and Figure (b) *Weissella viridescens*. The thin solid line represents the Bias (mean), while the standard deviations from the average difference of $\log_{10}$ are represented as dashed lines. The solid bold line represents the zero line. SD: standard deviation.



3.3.4 Primary modeling growth of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* using PC and PMA-qPCR in STH

In the present study, a mathematical model was used to assess the impact of different temperatures on the growth kinetics parameters of a cocktail of *L. mesenteroides* and a cocktail of *W. viridescens* in monoculture in STH. This assessment was conducted by the PC and PMA-qPCR methods, in relation to STH shelf life.

Figs. 3.6 and 3.7 present the growth curves of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in STH ($\log_{10}$ CFU/g), respectively, along with the Baranyi & Roberts model fits. This model is a biologically significant primary model commonly employed in the literature. Specifically, when STH samples were incubated at 8, 10, 12, 16 and 20 °C, the Baranyi & Roberts model proved effective in describing the growth of *L. mesenteroides* (Fig. 3.6) and *W. viridescens* (Fig. 3.7) cocktails for both methods, revealing sigmoidal growth curves. As expected, temperature had a strong impact on bacterial behavior. Comi & Iacumin (2012) and Comi et al. (2016) demonstrated that LAB can develop in vacuum-packaged meat products stored at refrigeration temperatures between 4 °C and 8 °C, which can cause spoilage.

According to Nychas et al. (2008), meat and meat products are typically contaminated during slaughtering, processing, and packaging, resulting in an initial microbial count of 2 to 3 $\log_{10}$ CFU/g. In the present study, initial counts of *L. mesenteroides* in STH ranged from 3.02 to 3.62 $\log_{10}$ CFU/g (Fig. 3.6) using both methods. These data considered all temperatures

evaluated. In Fig. 3.7, initial counts of *W. viridescens* ranged from 3.11 to 3.43 log₁₀ CFU/g for both methods used. The negative control samples (STH without inoculum) showed no signs of bacterial growth during the storage period, regardless of the temperature tested.

Figure 3.3 Growth curves of *Leuconostoc mesenteroides* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at (a) 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C quantified by plate count (PC, filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. The continuous and dashed lines indicate the fitting of Baranyi & Roberts (BAR) model to the experimental data obtained by PC and PMA-qPCR methods, respectively. The error bars show the standard deviation.

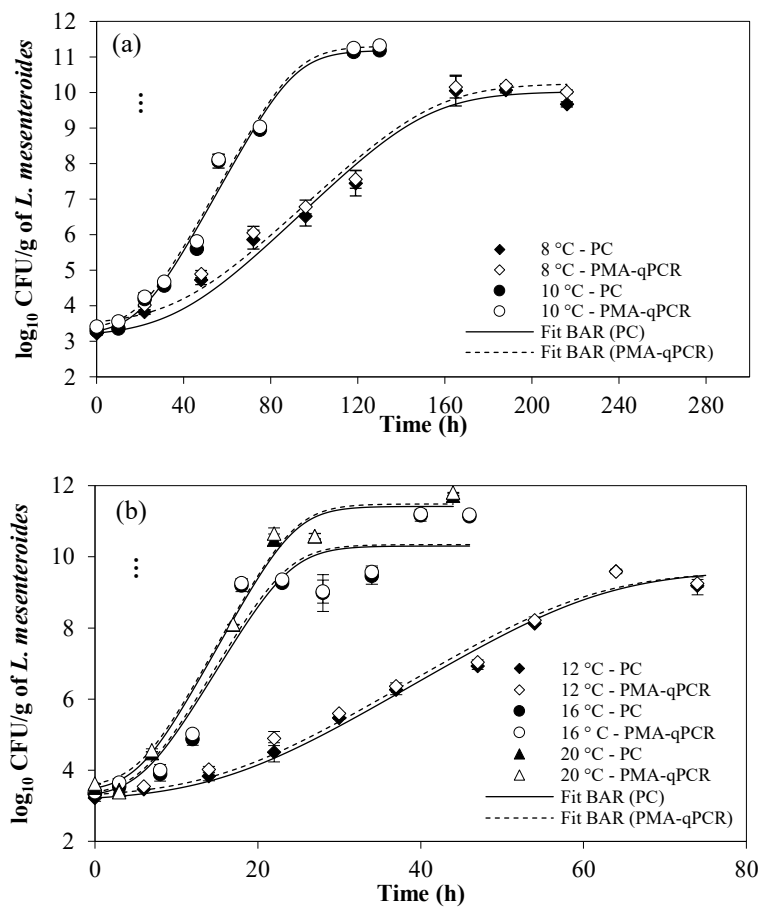
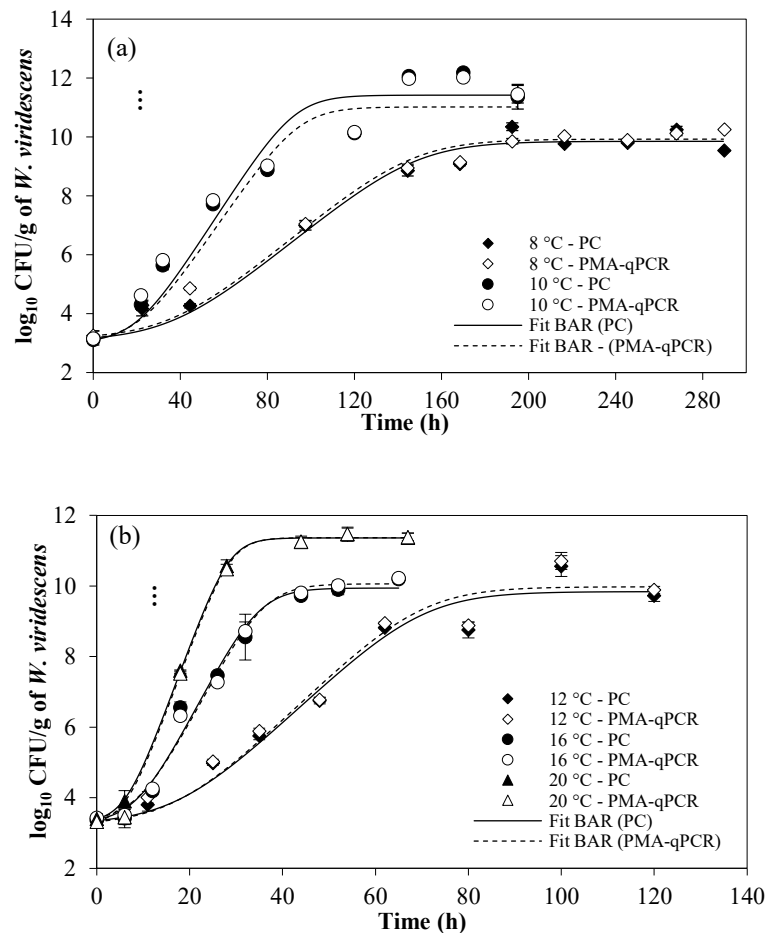


Figure 3.7 Growth curves of *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at (a) 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C quantified by plate count (PC, filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. The continuous and dashed lines indicate the fitting of Baranyi & Roberts (BAR) model to the experimental data obtained by PC and PMA-qPCR methods, respectively. The error bars show the standard deviation.



Tables 3.2 and 3.3 present the growth parameters ($\pm$ SD) estimated by the Baranyi & Roberts model [in two steps, with y_0 and h_0 fixed (section 2.6.3)], fitted to the experimental data of *L. mesenteroides* (Table 3.2) and *W. viridescens* (Table 3.3) in artificially inoculated STH at temperatures of 8, 10, 12, 16, and 20 °C. In the first step, the mean value ($\pm$ SD) for the h_0 parameter was calculated. The h_0 mean values for *L. mesenteroides* and *W. viridescens* by the PC method were 1.37 ($\pm$ 0.33) and 1.25 ($\pm$ 0.16), respectively. Using the PMA-qPCR method, the h_0 mean values were 1.37 ($\pm$ 0.41) for *L. mesenteroides* and 1.54 ($\pm$ 0.28) for *W. viridescens*. In the second step, the proposed model, with fixed y_0 and h_0 parameter values, was refitted to the experimental data and three model parameters (λ , μ_{max} , and y_{max}) were estimated. It is observed that the mean value of the h_0 parameter (Table 2) for *L. mesenteroides* was identical in both methods, while for *W. viridescens* the values were quite close, demonstrating the

equivalence of the PC method to the PMA-qPCR method for quantifying the kinetics of these LAB in STH under different storage conditions.

Table 3.2 Growth parameters ($\pm 95\%$ confidence interval) estimated by fitting of Baranyi and Roberts (BAR) model (second step, fixed h_0) to the experimental data of *Leuconostoc mesenteroides* in artificially inoculated sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at 8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.

Method	T (°C)	Experimental value	BAR model parameters (h_0 fixed = 1.37 ± 0.33)			Shelf life (days)*
		y_0 (log ₁₀ CFU/g)	μ_{max} (1/h)	λ (h)	y_{max} (log ₁₀ CFU/g)	
PC	8	3.22 (± 0.13)	0.061 (± 0.006)	22.62 (± 3.39)	10.02 (± 0.68)	4.25
	10	3.29 (± 0.15)	0.112 (± 0.010)	12.18 (± 1.52)	11.18 (± 0.70)	2.24
	12	3.02 (± 0.00)	0.172 (± 0.041)	7.89 (± 0.98)	11.53 (± 2.66)	1.83
	16	3.33 (± 0.01)	0.389 (± 0.085)	3.50 (± 1.13)	10.30 (± 1.07)	0.64
	20	3.50 (± 0.02)	0.418 (± 0.040)	3.27 (± 0.45)	11.42 (± 0.78)	0.58
Method	T (°C)	Experimental value	BAR model parameters (h_0 fixed = 1.37 ± 0.41)			Shelf life (days)*
		y_0 (log ₁₀ CFU/g)	μ_{max} (1/h)	λ (h)	y_{max} (log ₁₀ CFU/g)	
PMA-qPCR	8	3.35 (± 0.08)	0.059 (± 0.004)	23.31 (± 3.34)	10.25 (± 0.71)	4.13
	10	3.42 (± 0.15)	0.112 (± 0.009)	12.24 (± 1.40)	11.30 (± 0.63)	2.21
	12	3.32 (± 0.15)	0.142 (± 0.011)	9.62 (± 1.07)	9.60 (± 0.07)	1.79
	16	3.38 (± 0.02)	0.394 (± 0.083)	3.47 (± 1.09)	10.34 (± 1.03)	0.65
	20	3.62 (± 0.03)	0.416 (± 0.049)	3.29 (± 0.56)	11.48 (± 0.95)	0.56

y_0 is the initial cell concentration fixed in the model, h_0 fixed is the arithmetic mean of the experiments.

* Time taken to reach levels of 10^7 CFU/g.

Table 3.3 Growth parameters ($\pm 95\%$ confidence interval) estimated by fitting of Baranyi and Roberts (BAR) model (second step, fixed h_0) to the experimental data of *Weissella viridescens* in artificially inoculated sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at 8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.

Method	T (°C)	Experimental value y_0 (log ₁₀ CFU/g)	BAR model parameters (h_0 fixed = 1.25 ± 0.16)			Shelf life (days)*
			μ_{max} (1/h)	λ (h)	y_{max} (log ₁₀ CFU/g)	
PC	8	3.18 (± 0.34)	0.061 (± 0.008)	20.51 (± 3.65)	9.85 (± 0.41)	4.25
	10	3.11 (± 0.10)	0.115 (± 0.022)	10.89 (± 3.10)	11.42 (± 1.00)	2.25
	12	3.35 (± 0.06)	0.122 (± 0.012)	9.88 (± 1.85)	9.84 (± 0.75)	1.98
	16	3.38 (± 0.23)	0.241 (± 0.010)	5.19 (± 0.69)	11.41 (± 2.01)	0.97
	20	3.40 (± 0.07)	0.362 (± 0.009)	3.46 (± 0.12)	11.36 (± 0.11)	0.68
Method	T (°C)	Experimental value y_0 (log ₁₀ CFU/g)	BAR model parameters (h_0 fixed = 1.54 ± 0.28)			Shelf life (days)*
			μ_{max} (1/h)	λ (h)	y_{max} (log ₁₀ CFU/g)	
PMA-qPCR	8	3.25 (± 0.34)	0.061 (± 0.008)	24.91 (± 4.70)	9.93 (± 0.42)	4.13
	10	3.15 (± 0.10)	0.108 (± 0.015)	14.24 (± 2.90)	11.02 (± 0.69)	2.38
	12	3.32 (± 0.09)	0.130 (± 0.018)	10.55 (± 2.34)	9.98 (± 0.81)	1.92
	16	3.43 (± 0.23)	0.260 (± 0.029)	5.48 (± 0.66)	10.06 (± 0.42)	1.00
	20	3.32 (± 0.07)	0.362 (± 0.025)	3.79 (± 0.38)	11.37 (± 0.29)	0.69

y_0 is the initial cell concentration fixed in the model, h_0 fixed is the arithmetic mean of the experiments.

* Time taken to reach levels of 10^7 CFU/g.

The fitted growth curves exhibited a typical sigmoidal behavior in temperature ranges between 8 °C and 20 °C, with the maximum population exceeding 9 log₁₀ CFU/g (Figs. 3.5 and 3.6). An increase in the maximum specific growth rate (μ_{max} , 1/h) with rising temperature was observed for both LAB. For *L. mesenteroides*, μ_{max} ranged from 0.061 1/h to 0.418 1/h with data obtained by PC and from 0.059 1/h to 0.416 1/h with PMA-qPCR data. The lag time (λ) decreased from 22.62 h at 8 °C to 3.27 h at 20 °C with PC data and from 23.31 h at 8 °C to 3.29 h at 20 °C with PMA-qPCR data (Table 2). For *W. viridescens*, μ_{max} ranged from 0.061 1/h to 0.362 1/h for both PC and PMA-qPCR methods, while the λ decreased from 20.51 h at 8 °C to 3.46 h at 20 °C with PC data and from 24.91 h at 8 °C to 3.79 h at 20 °C with PMA-qPCR data (Table 3).

The study of *L. mesenteroides* growth in culture medium and meat products has been previously investigated using a combination of conventional and molecular methods, along with the tool of predictive microbiology. Severo (2018) employed PC and SYBR® Green qPCR methods to quantify the growth of *L. mesenteroides* ATCC 8293™ in MRS broth and fitted the Baranyi & Roberts model to estimate growth parameters at different temperatures. For instance, at a temperature of 8 °C, which corresponds to refrigeration temperature, this author observed a μ_{max} of 0.034 1/h using the PC method and 0.031 1/h with the SYBR® Green qPCR method. In contrast, Martins et al. (2020) reported higher growth rates of *L. mesenteroides* in blood sausages at the same temperature of 8 °C, with μ_{max} values of 0.053 1/h (PC method) and 0.052 1/h (TaqMan™ qPCR method). These results may be attributed to the authors' use of a cocktail of *L. mesenteroides* strains, which is like the approach used in this study, i.e., the use of the cocktail impacts the growth rate of this microorganism. According to Blackburn (2006), predictive models based on the growth of a cocktail of strains can increase confidence in the model's accuracy when predicting a variety of environmental scenarios. This suggests that using a cocktail of strains can provide more representative and robust results for modeling *L. mesenteroides* growth in different contexts. Additionally, in this study, the growth rate of *W. viridescens* at 8 °C, measured by PMA-qPCR, was similar to the values reported by Martins et al. (2020) in blood sausages using TaqMan™ qPCR, as well as by Silva et al. (2018) in MRS broth using PC method. These findings highlight the efficient growth capacity of *W. viridescens* in culture medium and cooked meat products, although their growth is slower than others LAB in refrigerated meat products (Vermeiren et al., 2005).

The growth of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* at the lowest studied temperature of 8 °C suggests a shelf life of approximately 4.25 days for STH based on the model fitted to PC data, and 4.13 days based on PMA-qPCR data. Furthermore, when considering a

temperature variation from 8 °C to 10 °C, the STH shelf life was reduced from 4.25 days to 2.21 days based on the growth of *L. mesenteroides* (Table 2). These findings reveal that a 2 °C increase in storage temperature can reduce the shelf life of the meat product. Similar results were observed for *W. viridescens* (Table 3.3). It was observed that at concentrations below 10^7 CFU/g, all vacuum-packaged samples were in good condition at all temperatures studied. However, when concentrations reached or exceeded 10^7 CFU/g, the samples began to show exudate in the packaging, the onset of slime formation, and loss of vacuum in the packaging.

According to various authors, the shelf life of a food can be determined through sensory and/or microbiological analyses. In RTE meat products (such as STH) microbiological analyses, there is a strong correlation between sensory changes that define the end of shelf life and the time needed for the LAB count to reach 10^7 CFU/g (see section 2.6.3) in different meat products (Diez et al., 2009; Martins et al., 2020; Menezes et al., 2018; Rodríguez-Pérez et al., 2003; Slongo et al., 2009; Sun & Holley, 2012). Therefore, maintaining the cold chain of meat and meat products is crucial, as temperature variations are common across all stages of the distribution chain. For example, transportation temperatures often exceed the specified maximum limit and can reach ambient temperatures on retail shelves (Koutsoumanis et al., 2006; Papuc et al., 2017; Zhao et al., 2022).

The values of the statistical indices (R^2 , $RMSE$, A_f , and B_f) were used to assess the performance of the Baranyi & Roberts model to describe the growth of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in STH obtained by the PC and PMA-qPCR methods for each temperature. The mean R^2 values ($\pm$ SD) were high, for *L. mesenteroides* and *W. viridescens* were $0.973 (\pm 0.025)$ and $0.976 (\pm 0.017)$, respectively, and the $RMSE$ values for *L. mesenteroides* and *W. viridescens* were less than or equal to 0.876 and 0.834 $\log_{10}$ CFU/g, respectively, for both methods. Regarding A_f and B_f , all fits for both bacteria and both methods had values greater than $0.9 \leq B_f$ and less than 1.1. Previous studies have shown that a model has good predictive ability when its $RMSE$ value is close to 0 and A_f and B_f values are between 0.9 and 1.1 (Choi et al., 2019; Longhi et al., 2017; Silva et al., 2017). All statistical indices indicate that the model performed well in describing the observed data for the studied conditions and methods. A good fit of the Baranyi & Roberts model has already been verified previously by Longhi et al. (2017), Martins et al. (2016), and Silva et al. (2018).

3.3.5 Secondary modeling of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* using PC and PMA-qPCR in STH

In this study, the secondary Exponential [Eq. (3.7)] and Ratkowsky Square Root [(Eq. (3.8)] models were fitted to evaluate the effect of storage temperature (8, 10, 12, 16 and 20 °C) on the μ_{max} values obtained from the proposed primary model for *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in STH using the PC and PMA-qPCR methods. Table 3.4 presents the estimated parameters for the secondary models generated by PC and PMA-qPCR, along with the values of the statistical indices (R^2 and $RMSE$). The fit of the secondary models for μ_{max} is shown in Fig. 3.8. The results confirm that the cocktail of each LAB in STH, when stored at constant temperatures between 8 °C and 20 °C, exhibited growth as expected, with an increase in growth rate as the temperature increased, as mentioned previously.

The Ratkowsky square root secondary model more precisely described the influence of temperature on the μ_{max} parameter of the models generated by PMA-qPCR and PC for both LAB. The results show R^2 values ≥ 0.927 and $RMSE \leq 0.057$ for *L. mesenteroides*, and R^2 values ≥ 0.984 and $RMSE \leq 0.021$ for *W. viridescens*. Additionally, the exponential model also adequately represented the influence of temperature on the μ_{max} parameter for the PMA-qPCR and PC models in *W. viridescens*, with R^2 values ≥ 0.970 and $RMSE \leq 0.019$, as illustrated in Table 4.

In the Ratkowsky square root model, T_{min} is the minimum temperature that facilitates bacterial growth. Comparing the PC and PMA-qPCR methods, we observed slight differences in T_{min} estimates for *L. mesenteroides* and *W. viridescens*, with *W. viridescens* showing lower T_{min} values compared to *L. mesenteroides*. The growth ability of *W. viridescens* at low temperatures was reported by Martins et al. (2020) and Silva et al. (2018), who demonstrated the growth of the bacterium at -1.98 °C and -1.36 °C in cooked meat products and culture medium, respectively.

Figure 3.8 Fitting of secondary models to describe the influence of temperature on μ_{max} parameter data of (a) *Leuconostoc mesenteroides* and (b) *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham obtained by PC (filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. Continuous lines represent the fitting of Ratkowsky square root secondary model (circle symbols data, primary axis), and dashed line represents the fitting of exponential secondary model (symbols lozenge data, secondary axis).

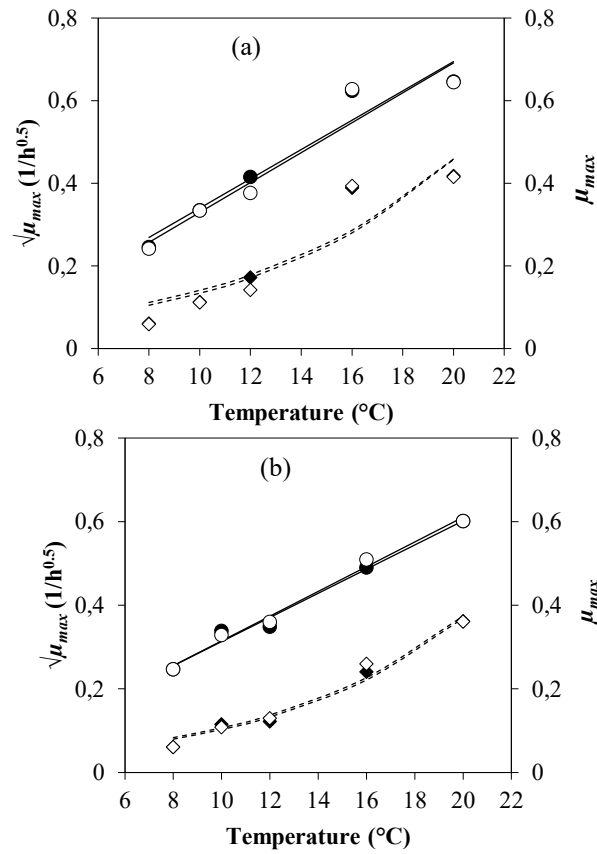


Table 3.4 Estimated parameter values ($\pm$ confidence interval) (a, b, c and T_{min}) of the fitting of Exponential and Ratkowsky square root secondary models to μ_{max} parameter values and the statistical indexes (R^2 and RMSE).

Species	Methods	Secondary models							
		Exponential				Ratkowsky square root			
		a (1/h)	b (1/°C)	R^2	RMSE	c (1/(°C $\sqrt{h}$))	T_{min} (°C)	R^2	RMSE
<i>WV</i>	PC	0.029 ($\pm$ 0.019)	0.128 ($\pm$ 0.036)	0.982	0.019	0.029 ($\pm$ 0.007)	- 0.84 ($\pm$ 3.41)	0.984	0.020
	PMA-qPCR	0.031 ($\pm$ 0.026)	0.125 ($\pm$ 0.047)	0.970	0.025	0.030 ($\pm$ 0.006)	- 0.64 ($\pm$ 2.74)	0.990	0.017
<i>LM</i>	PC	0.043 ($\pm$ 0.082)	0.118 ($\pm$ 0.106)	0.853	0.072	0.035 ($\pm$ 0.017)	0.42 ($\pm$ 6.45)	0.937	0.051
	PMA-qPCR	0.039 ($\pm$ 0.083)	0.123 ($\pm$ 0.119)	0.838	0.078	0.036 ($\pm$ 0.019)	0.90 ($\pm$ 6.73)	0.927	0.057

WV: *Weissella viridescens*. *LM*: *Leuconostoc mesenteroides*

3.4 CONCLUSION

This study compared the PMA-qPCR and PC methods, both combined with predictive modeling, to describe the growth of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in sliced, vacuum-packaged smoked turkey ham under different storage temperatures (8, 10, 12, 16 and 20 °C). Both methods showed good correlation and agreement in quantifying microbial growth curves; however, the PC method underestimated the growth of *W. viridescens* at 8 °C, suggesting bacterial stress at lower temperatures. The Baranyi & Roberts model, along with secondary exponential and square root models, adequately described these curves.

The implications of this study are significant for the fields of microbiology and food quality, especially concerning the safety of ready-to-eat meat products. The identification of a more precise molecular method, such as PMA-qPCR, which can detect bacterial responses under stress conditions, suggests its potential application for developing more robust predictive models for the food industry, particularly in refrigeration scenarios.

Future studies are essential to validate the PMA-qPCR method at temperatures below 8 °C and to investigate the influence of intrinsic factors, such as water activity, pH, and salt concentration, on the shelf life of meat products, contributing to the ongoing enhancement of safety and quality standards in the industry.

Capítulo 4

4 ENSAIO DE QPCR COM PROPÍDIO MONOAZIDA (PMA) COMPARADO AO MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA PARA QUANTIFICAR O CRESCIMENTO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA ENTERICA* EM PEITO DE PERU EMBALADO A VÁCUO, COMBINADO COM UMA ABORDAGEM DE MODELAGEM MATEMÁTICA.

No capítulo 4, um coquetel de três sorotipos de *Salmonella enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*) foi inoculado artificialmente em fatias de peito de peru. O objetivo do estudo foi avaliar a importância da manutenção da cadeia do frio no crescimento dessa bactéria patogênica. Para tal, foram utilizados os métodos de contagem em placa (PC) e PMA-qPCR em conjunto com ferramentas de microbiologia preditiva.

Os dados deste capítulo foram submetidos em um periódico internacional (Qualis CAPES A1) em 2024 como manuscrito científico intitulado “Propidium Monoazide (PMA) qPCR assay compared to the plate count method for quantifying the growth of *Salmonella enterica* serotypes in vacuum-packaged turkey breast combined with a mathematical modeling approach” e está apresentado a seguir.

Abstract

This study compares the plate count (PC) and the Propidium Monoazide-quantitative Polymerase Chain Reaction (PMA-qPCR) methods to assess the growth of a cocktail of three serotypes of *Salmonella enterica* (Heidelberg, Typhimurium, and Enteritidis) in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast (STB) under isothermal storage temperatures (8°C to 20°C), using predictive models. Standard curves were developed for PMA-qPCR, demonstrating high efficiency (101%) and sensitivity, with quantification limits ranging from 1 to 2 log₁₀ CFU/g for all temperatures studied. Comparative analysis revealed a significant correlation ($R^2 = 0.99$; 95% CI) between the PC and PMA-qPCR methods; however, the agreement analysis indicated a mean difference (Bias) of -0.11 log₁₀ CFU/g ($p < 0.05$), suggesting underestimation by the PC method. This indicates the presence of stressed or viable but nonculturable (VBNC) cells, detectable by PMA-qPCR but not by PC. The Baranyi and Roberts model showed a good ability to describe the behavior of *S. enterica* cocktail in STB for PC and PMA-qPCR data under all isothermal conditions. The exponential secondary model more accurately represented the temperature dependence of the maximum specific growth rate compared to the Ratkowsky square root model, with R^2 values ≥ 0.984 and $RMSE$ values ≤ 0.011 for both methods. These results suggest that combining PMA-qPCR with predictive modeling allows for a more accurate prediction of *S. enterica* growth, compared to PC method. In the event of cold chain disruptions of meat products, the use of PMA-qPCR method allow the quantification of VBNC cells, that can still pose a health risk to consumers, especially in ready-to-eat products.

Keywords: Poultry products. *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella* Typhimurium. *Salmonella* Heidelberg. VBNC. Molecular method. Predictive modeling. Food safety.

4.1 INTRODUCTION

Salmonella enterica is a Gram-negative pathogenic bacterium responsible for causing a wide range of illnesses in humans, from septicemia, and gastroenteritis to fatal cases (Gieraltowski et al., 2016; Mohammad et al., 2019). In Brazil, non-typhoidal serotypes, such as *S. enterica* serotype Heidelberg (*S. Heidelberg*) and *S. enterica* serotype Minnesota (*S. Minnesota*), have been gaining prominence (Kipper et al., 2021, 2020; Monte et al., 2019; Voss-Rech et al., 2019), although Typhimurium and Enteritidis serotypes are still the most prevalent in human diseases, often associated with poultry and their products (eggs, chicken, turkey) (Jajere, 2019; Mandilara et al., 2021; Murase et al., 2018; Rau et al., 2021; Sher et al., 2021).

Ensuring the quality and safety of poultry meat for human consumption is a crucial challenge for the industry, especially in the context of the growing demand for these products (ABPA, 2024; Pulido-Landínez, 2019). Among the various public health hazards, *Salmonella* spp. stands out as one of the main contaminants in poultry products, including ready-to-eat (RTE) ones (Ehuwa et al., 2021; Juneja et al., 2007; Mengistu et al., 2022). This concern is heightened considering the numerous outbreaks of salmonellosis associated with refrigerated RTE products, such as the presence of *S. enterica* in chicken meat (Akbar and Anal, 2015; Barcenilla et al., 2022) and contamination by *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* in smoked turkeys (Mahgoub et al., 2024).

Inadequate storage of poultry products can promote the proliferation of *Salmonella* spp. to dangerous levels for human consumption. Moreover, this bacterium's ability to survive under refrigeration conditions further increases the risk of cross-contamination (Birk et al., 2004; El-Shibiny et al., 2009). To ensure food safety, several countries, including Brazil, require the absence of *Salmonella* spp. in products after processing and throughout the shelf life (Brazil, 2022; EC, 2005). In Brazil, the Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA) recently established stringent measures to ensure the safety of poultry products (Brazil, 2019). Among these measures, the obligation to establish and validate acceptable temperature variation during cutting and handling based on predictive microbiology studies. The aim was to stablish the adequate time-temperature combination to inhibit pathogen multiplication and toxin production.

Predictive microbiology emerges as a tool to assess microbiological risks in food products. Through predictive models, it is possible to forecast the growth and behavior of pathogens and spoilage microorganisms, providing support for the implementation of effective

control measures and warranting food safety (Tarlak, 2023). The development of these models is based on data collection, with the conventional plate counting method being the most used to monitor microbial growth kinetics (Rolfe et al., 2012). However, it is important to consider that non-spore-forming pathogenic bacteria may enter in a viable but nonculturable (VBNC) state (Lazou et al., 2021). In this condition, bacteria remain metabolically active but unable to form colonies on traditional culture media, which can lead to an underestimation of microbial growth and affect the accuracy of predictive models (Oliver, 2010).

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) has emerged as an innovative technique for rapid, specific, and high-capacity quantification of pathogenic bacteria in food (Beterams et al., 2023; Noviyanti et al., 2021; Sun et al., 2024). Several studies have demonstrated the application of qPCR to monitor the growth kinetics of pathogens such as *S. Enteritidis* in chicken juice (Noviyanti et al., 2018), *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed pork (Ye et al., 2013), *Staphylococcus aureus* in pork (Guan et al., 2017), *Salmonella* spp. in pasteurized and unpasteurized milk (Kawasaki et al., 2014), and *L. monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* in cooked shrimp (Liao et al., 2015). Despite the high sensitivity and specificity of qPCR, an important challenge lies in differentiating between viable and dead cells, as the technique quantifies all DNA present in the sample (Rodgers et al., 2017).

The development of the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique with an intercalating dye, such as propidium monoazide (PMA), opens up new possibilities for differentiating between viable and dead cells in pathogen analyses in food (Pacholewicz et al., 2019; Wulsten et al., 2020). This technique prevents the amplification of DNA released by dead cells, providing a more accurate assessment of microbial viability. To the best of our knowledge, there are no published studies that combine the PMA-qPCR method with predictive modeling for the detection and quantification of different serotypes of *S. enterica* in cooked poultry products, especially cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast. Therefore, the present study aims to advance predictive modeling using molecular data obtained by PMA-qPCR to describe the growth of a cocktail of three serotypes of *S. enterica* (Heidelberg, Typhimurium, and Enteritidis) in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast stored at different temperatures (8°C, 10°C, 12°C, 16°C, and 20°C). Additionally, the predictive models established by the PMA-qPCR method will be compared with the results obtained by the traditional plate count method, allowing a comprehensive evaluation of the accuracy and reliability of each technique for the detection and quantification of *S. enterica* in RTE poultry products.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Turkey breast samples

This study utilized commercially purchased whole turkey breast. To ensure freshness, only pieces with a manufacturing date less than 15 days old were selected. These turkey breasts were stored at a refrigeration temperature of 4°C until analysis.

Prior to processing, the turkey breasts were disinfected to minimize surface bacterial contamination. This disinfection followed the method outlined by Menezes et al. (2018) with alcohol 70% (v/v). To prepare the samples, aseptic techniques were employed within a laminar flow chamber to minimize airborne contamination. The turkey breasts were sliced using a cold slicer (Metvisa, CFIE 250) set to a thickness of 1.5 mm. To further prevent contamination, both the slicer and utensils used were sanitized previously with 70% ethanol and exposed to UV light for approximately 30 minutes.

4.2.2 Physical-chemical characterization of turkey breast

The turkey breast samples were evaluated for pH, water activity (a_w), and chloride concentration [later converted to sodium chloride concentration (NaCl)]. For the a_w evaluation, 3.5 g of shredded turkey breast sample was used. The analyses were performed using an a_w meter (Aqualab, SERIES 3T3 model). The pH determination was carried out with triplicate measurements by insertion into three equidistant points in the turkey breast samples, using a pH meter for solid foods (Texto, model 205).

The NaCl concentration in the turkey breast samples was determined through total chloride analysis, followed by conversion to sodium chloride (Aliño et al., 2011). For total chloride determination, approximately 4 g of the samples were crushed with distilled water and homogenized using the Ultra Turrax digital (IKA, T25) at 20,000 rpm for 1 minute. The resulting homogenate was transferred to a volumetric flask and diluted to 100 mL with distilled water. The solution was then centrifuged (Sigma, 4k15) at 9,000 rpm for 10 minutes. A 0.5 mL aliquot of the supernatant was withdrawn and analyzed using a chloride analyzer (Cole Parmer, 926). The results were reported in milligrams of Cl per liter of solution, with the equipment resolution being 1 mg/L. Using this value, the NaCl concentrations in the samples were calculated using Eq. (4.1).

$$X_{NaCl} = \left(\frac{L \cdot V}{m} \right) \cdot \left(\frac{M_{NaCl}}{M_{Cl}} \right) \cdot 100 \quad (4.1)$$

where X_{NaCl} = sodium chloride concentration (g NaCl/100 g of STB), L = equipment reading (g Cl/L of solution), V = volume in liters of solution (samples + distilled water), M_{NaCl} = molar mass of sodium chloride (58.44 g/mol) and M_{Cl} = molar mass of chloride (35.45 g/mol).

4.2.3 Microorganisms and inoculum preparation

This study employed three distinct serotypes of *S. enterica*. Two well-established reference strains were used: *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 14028™ and *S. enterica* serotype Enteritidis ATCC 13046™. Additionally, a strain of *S. enterica* serotype Heidelberg, isolated from a poultry processing plant in Santa Catarina, Brazil, was also used.

All *S. enterica* strains were grown in Brain-Heart Infusion (BHI) broth (Kasvi®, Brazil) for 24 hours at 37 °C. Following incubation, individual suspensions were frozen at -80 °C in BHI broth containing 30% glycerol for preservation.

To prepare the inoculum for each serotype of *S. enterica*, 100 µL of the frozen suspensions were thawed and inoculated into separate tubes containing 10 mL of fresh BHI broth. These cultures were incubated for 24 hours at 37 °C before being plated onto Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG - Kasvi®, Brazil). A single colony was chosen from each VRBG plate and transferred to a new tube containing 5 mL of BHI broth. The culture was incubated with shaking at 210 rpm for 24 hours at 37 °C. Subsequently, this culture was subcultured for an additional 18 hours. After the final incubation, the cultures were centrifuged at 380 rpm (16 × g) for 7 minutes. Standardized dilutions were then prepared using peptone water. Finally, a cocktail containing equal volumes of each standardized suspensions was prepared in BHI broth, resulting in a combined inoculum with an estimated concentration of approximately 1×10^8 CFU/mL.

4.2.3.1 Sample preparation for *Salmonella enterica* cocktail quantification

In this experiment, samples were artificially contaminated. Slices of cooked turkey breast, each averaging 14 g, were inoculated with 100 µL of a *S. enterica* cocktail containing

approximately 1×10^6 CFU/mL. This resulted in an estimated initial concentration of 1×10^3 CFU/g on the cooked turkey breast slices. The cocktail was spread evenly across the surface of the meat to ensure uniform distribution. A separate group of slices was selected as a negative control and received 100 μ L of sterile water instead of the *S. enterica* cocktail. The initial concentration of the *S. enterica* cocktail was determined using the plate count (PC) and PMA-qPCR methods.

4.2.3.2 Sample packaging

Each sample was placed in a two-part packaging system. The primary package, made of sterile, DNase/RNase-free plastic with a 540 milliliter (mL) capacity, directly held the meat slice. This package was folded and heat-sealed for closure. Then, for additional protection, it was placed inside a secondary package designed for refrigerated and vacuum-sealed foods. Finally, the secondary package was evacuated of air and sealed using a CETRO DZ-260C vacuum sealer.

4.2.4 Storage conditions

Cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast samples (STB) were subjected to different storage temperatures. The samples were stored at constant temperatures of 8°C, 10°C, 12°C, 16°C, and 20°C. This range was chosen to investigate the impact of temperature control throughout the cold chain on the shelf life of vacuum-packaged meat products. The temperature of $\leq 8^\circ\text{C}$ is frequently used as a reference for the storage of refrigerated meats (Ndraha et al., 2018) and is common in domestic refrigerators (Garrido et al., 2010). Studies such as Brenes et al. (2020) demonstrate a wide temperature variation in retail settings (-1°C to 16°C). Therefore, by including intermediate temperatures at 4°C intervals (12°C , 16°C , and 20°C), we achieve a more detailed analysis of microbial behavior under different temperature conditions, enabling a more reliable extrapolation to real-world scenarios. This approach is based on previous studies from our research group (Martins et al., 2020; Menezes et al., 2018). The temperature within the storage environment was continuously monitored using a Testo mini data logger (model 174H, Testo AG, Lenzkirch, Germany).

4.2.5 Quantification of *Salmonella enterica* cocktail in STB

All artificially inoculated STB samples were analyzed on different days. Samples were collected at predetermined intervals corresponding to the storage temperatures (8°C, 10°C, 12°C, 16°C, and 20°C) for each *S. enterica* cocktail growth curve in STB. Sterile homogenization bags (DNase/RNase-free) were filled with the STB, and peptone water (1%, w/v) was added in a 9:1 ratio [volume peptone water (mL): STB mass (g)]. The suspension was then agitated in a Stomacher (ITR model 1204) for 1 minute to perform the initial dilution (10^{-1}). From this dilution, microbial growth curves were established in duplicate using PC and PMA-qPCR methods, up to the stationary growth phase.

4.2.5.1 Growth curves by PC method

For the PC method, bacterial counting was performed at predetermined time intervals (according to the temperature studied). Aliquots of 100 μ L of the dilutions were plated on VRBG Agar surface for *S. enterica* cocktail quantification, and then incubated at 37 °C for 24 h. The mean CFU/g count (and standard deviation) of two independent samples from each sampling point of the growth curve was calculated and used to determine the growth kinetics.

The initial concentrations for the *S. enterica* cocktail used in this article were based on the study conducted by Werlang et al. (2021), who found concentrations of 2.749 and 3.368 $\log_{10}$ CFU/g of *Salmonella* serotype cocktail for meat sausage (salami after maturation).

4.2.6 Growth curves by PMA-qPCR method

4.2.6.1 Pre-treatment with PMAxx™

According to the manufacturer's recommendations, 100 μ L of PMAxx™, an improved version of PMA (Biotium Inc., Fremont, CA, USA), was diluted in 900 μ L of ultrapure water to form a 20 mM stock solution (stored at -20°C in a dark environment). The concentration of PMAxx™ was selected as 25 μ M, which was the optimized concentration that has been proven to be sufficient to mark all dead *Salmonella* cells (Liang et al., 2011; Wang et al., 2015). An appropriate volume of PMAxx™ stock solution was added to a 2 mL tube containing 500 μ L of cell suspension to yield a final PMAxx™ concentration of 25 μ M. To preserve the ability of

PMAxx™ to be activated by light, all experiments were conducted in the dark. After the addition of PMAxx™, the tubes were incubated in the dark at room temperature for 10 minutes with intermittent shaking. They were then exposed to LED light for 15 minutes using the PMA Lite™ LED Photolysis Devices (Biotium Inc., Fremont, CA, USA), with shaking every 5 minutes. Subsequently, the PMAxx™ treated samples were centrifuged at $6,000 \times g$ for 10 minutes and the supernatant was discarded. The pellets were resuspended in 500 μ L of Milli-Q water in the same tube and stored at -80°C until DNA extraction.

4.2.6.2 Genomic DNA extraction

Genomic DNA from STB samples was extracted in duplicate from PMAxx™-treated suspensions. After centrifugation at $6,000 \times g$ for 10 minutes, genomic DNA was isolated using the DNeasy® PowerFood® Microbial Kit (Qiagen, United Kingdom), according to the manufacturer's instructions.

4.2.6.3 PMA-qPCR assay conditions

The PMA-qPCR assays were run on a QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). To ensure accurate and consistent results, each sample was analyzed in triplicate. The primer sequences used in the qPCR assay were GCT GCT TTC TCT ACT TAA C (forward) and GTA ATG GAA TGA CGA ACA T (reverse), and the TaqMan™ probe sequence was FAM-CATCACCATTAGTACCAGAATCAGT-BHQ1, which amplifies a 95 bp fragment targeting the *invA* gene of *S. enterica* (Heymans et al., 2018). The reaction mixture for each sample contained 10 μ L of FastStart™ Universal Probe Master (ROX) kit (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), specific qPCR TaqMan™ primers and probe, and nuclease-free Milli-Q water to bring the final volume to 20 μ L. Finally, 2 μ L of the extracted DNA, isolated from the PMAxx™ treated samples, was added as the template for the PCR reaction.

The thermal cycling program consisted of an initial denaturation step at 95°C for 15 minutes, followed by 40 cycles of amplification. Each amplification cycle included a denaturation step at 94°C for 60 seconds and an annealing/extension phase at 60°C for 60 seconds (Heymans et al., 2018).

4.2.6.4 Generation of standard curves

The standard curves were constructed by correlating the average quantification cycle (C_q) values from four PMA-qPCR runs conducted in two independent experiments (with duplicate extractions) with concentrations of the *S. enterica* cocktail in $\log_{10}$ of the CFU/g of artificially inoculated STB for each growth curve, determined by PC. The C_q values were obtained from DNA extracted from an experimental point in the stationary phase of each growth curve in this study. To quantify the amount of genomic DNA, standard curves were prepared by serial dilution. Genomic DNA was diluted 10 times in Milli-Q water to final concentrations ranging from 1×10^1 to 1×10^9 CFU/g. All qPCR runs were analyzed using the software's automatic settings. Non-inoculated STB samples were analyzed as negative controls in triplicate.

The values of the limit of detection (LoD) and the limit of quantification (LoQ) were established according to Kubista et al. (2006). To assess the amplification efficiency of the PMA-qPCR method, the various bacterial concentrations ($\log_{10}$ CFU/g) were graphically plotted against their corresponding C_q values. The slope of the curve (S) was used to calculate the amplification efficiency E , using Eq. (4.2), as described by Bustin (2002).

$$E = [10^{(-1/S)} - 1] \times 100 \quad (4.2)$$

4.2.6.5 Generation of growth curves by PMA-qPCR

To quantify the *S. enterica* cocktail in STB using PMA-qPCR, the standard curve equations were utilized to relate C_q values to $\log_{10}$ CFU/g values, thereby generating a growth curve expressed as $\log_{10}$ CFU/g by PMA-qPCR.

4.2.7 Comparative analysis between methods

The trend lines of linear regression and determination coefficients between the PC and PMA-qPCR methods were calculated using Pearson's correlation test and linear regression analysis by the Passing-Bablok technique (Passing; Bablok, 1983), with a 95% confidence interval (95% CI). The agreement limits of the two methods were assessed through a Bland-Altman plot (Bland; Altman, 1986). Both the regression and Bland-Altman plot were generated

using Microsoft® Excel® 365 software, version 2204 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA), with a significance level set at $p < 0.05$.

4.2.8 Growth modeling

4.2.9 Primary and secondary models of microbial growth

The growth model of Baranyi and Roberts (BAR model) (Baranyi, J.; Roberts, 1994) [Eqs. (4.3), (4.4) and (4.5)] was used to describe the growth of *S. enterica* cocktail in STB.

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}F(t) - \ln \left\{ 1 + \frac{\exp^{\mu_{max}F(t)} - 1}{\exp^{y_{max} - y_0}} \right\} \quad (4.3)$$

$$F(t) = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln [\exp^{(-\mu_{max}t)} + \exp^{(-h_0)} - \exp^{(-\mu_{max}t - h_0)}] \quad (4.4)$$

$$h_0 = \mu_{max}\lambda \quad (4.5)$$

where $F(t)$ is the fitting function, $y(t)$ is the microbial concentration [$y = \log_{10} (N \text{ (CFU/g)})$] at time $t(h)$, y_0 is the initial microbial concentration, y_{max} is the maximum population concentration, μ_{max} is the maximum specific growth rate (1/h), λ is the duration of the lag phase (h), and h_0 is the parameter related to the physiological state of the cells (dimensionless).

For a deeper analysis of the temperature's impact on the maximum specific growth rate (μ_{max}) parameter, two secondary models were evaluated. The selected models included the Exponential Equation model [Eq. (4.6)] and the Ratkowsky Square Root model (Ratkowsky *et al.*, 1982) [Eq. (4.7)].

$$\mu_{max} = ae^{(bT)} \quad (4.6)$$

$$\sqrt{\mu_{max}} = c(T - T_{min}) \quad (4.7)$$

where a , b , and c are empirical parameters of the model, and T_{min} is the minimum temperature where growth is observed.

4.2.10 Numerical analysis

A estimation of the primary parameters (Baranyi model) was carried out in two steps. In the first step, the parameter y_0 was fixed (with the initial concentration determined experimentally) (da Costa et al., 2024; Paganini et al., 2022), and the parameters (λ , μ_{max} , and y_{max}) were estimated by adjusting the model to the experimental data. After, the arithmetic mean of the parameter h_0 for each temperature was calculated. In the second step, average value of h_0 and y_0 were fixed, and the parameters λ , μ_{max} , and y_{max} were estimated through a new adjustment for each temperature, following the methodology proposed by Baranyi et al. (1995).

4.2.11 Evaluation of model performance

The coefficient of determination (R^2) (Soper *et al.*, 1916), root mean square error (RMSE), bias factor (B_f), and accuracy factor (A_f) were employed to assess the predictive growth model validation.

The R^2 is commonly used as a global measure of prediction accuracy. The Eq. (4.8) was used to calculate the R^2 values.

$$R^2 = \left\{ \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred} - y_{obs})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs} - \bar{y})^2} \right] \right\} \quad (4.8)$$

The RMSE assesses the adequacy of predictive models using the root of the difference between the experimental values and the predicted values for the maximum specific growth rate [Eq. (4.9)].

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (y_{pred} - y_{obs})^2}{n-p}} \quad (4.9)$$

The bias factor (B_f) indicates whether the observed values are above or below the reference line compared to the expected mean and, if so, what is the magnitude of this difference [Eq. (4.10)].

$$B_f = 10^{\left[\frac{\sum \log(y_{pred}/y_{obs})}{n} \right]} \quad (4.10)$$

The accuracy factor (A_f) represents the absolute values of the mean difference between the experimentally obtained values and the values predicted by the secondary model [Eq. (4.11)].

$$A_f = 10^{\left[\frac{\sum |\log(y_{pred}/y_{obs})|}{n} \right]} \quad (4.11)$$

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Physical-chemical characterization of turkey breast

The pH, a_w , and NaCl concentration mean values for characterizing turkey breast were determined in triplicate and measured on the day of purchase of the turkey breast pieces. The mean values, along with their respective standard deviations (SD), for pH, a_w , and NaCl in this study were 6.18 (± 0.005), 0.98 (± 0.009), and 1.32 (± 0.005), respectively. Possas et al. (2017) examined the centesimal composition of turkey breast meat products in their study and found pH values ranging from 6.15 to 6.45, a_w between 0.97 and 0.98, and NaCl concentration between 1.3 and 2.5%, which support the results obtained in this study. Based on these analyses, it can be concluded that the turkey breast samples used demonstrate the expected characteristics of this product.

4.3.2 Development of the standard curve for PMA-qPCR assay

To establish an accurate quantification of DNA from the cocktail of three *S. enterica* serotypes, standard curves were prepared to determine the parameters of the PMA-qPCR technique, such as efficiency, slope, and coefficient of correlation (R^2). The average efficiency was 101% with an average slope of -3.21 (Fig. 4.1).

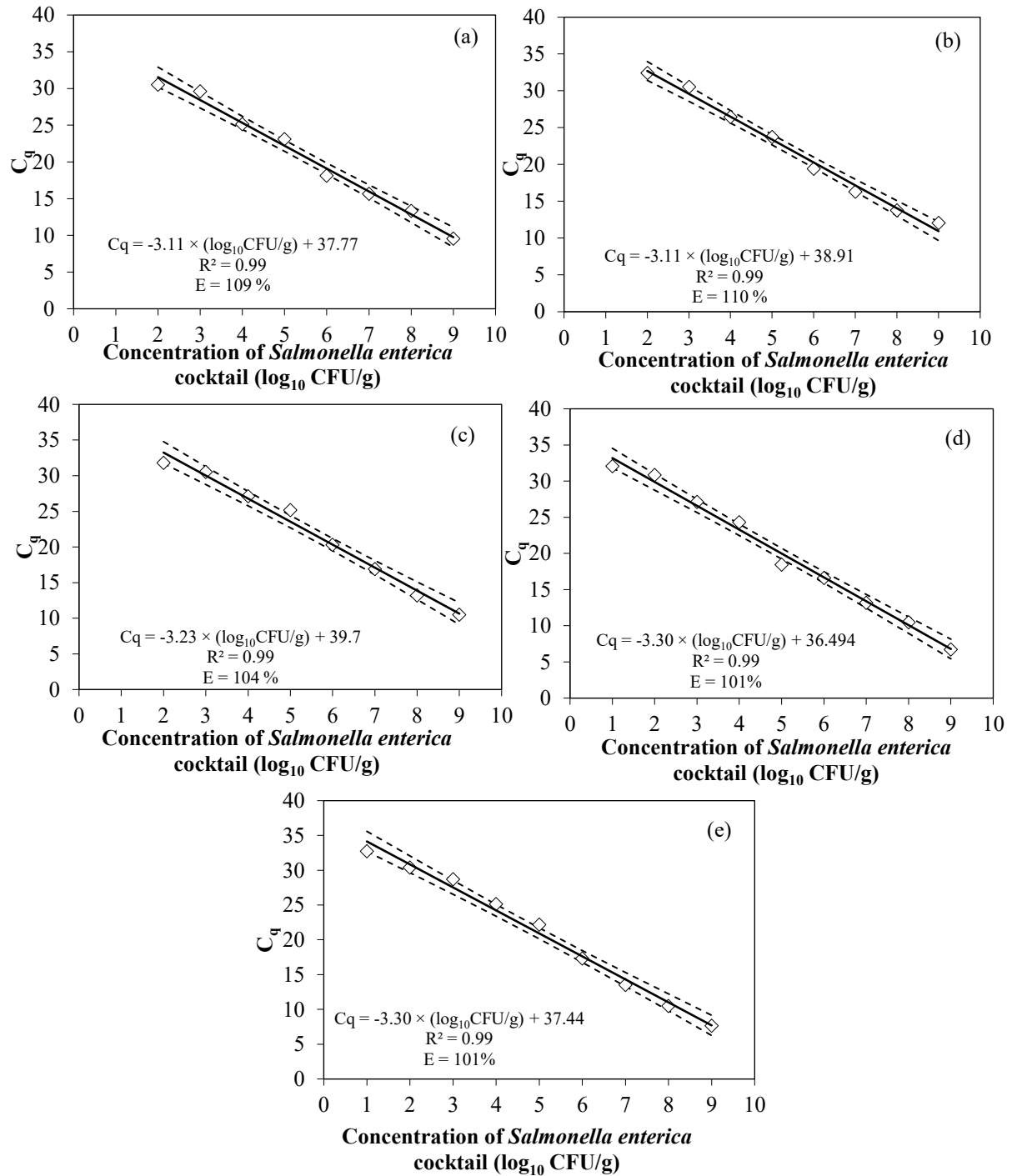
All standard curves demonstrated linear correlation coefficients above 0.99. A consistent standard curve should have an R^2 value above 0.95 and a slope between -3.0 and -

3.9, corresponding to PCR efficiencies between 80% and 115% (Kralik and Ricchi, 2017), all curves established in this study displayed reliable qPCR parameters.

The LoD is defined as the smallest amount of analyte (DNA) in a sample that can be reliably detected. In PMA-qPCR assays, the LoD represents the amount of DNA at which 95% of positive samples are detected, while the LoQ represents the smallest amount of analyte that can be quantified with an acceptable level of uncertainty (Kralik and Ricchi, 2017). Several authors have observed that the LoD is 5 to 10 times lower than the LoQ for complex samples (Berdal and Holst-Jensen, 2001; Papic et al., 2014).

In the present study, the LoQ for the *S. enterica* cocktail in STB was 2 log₁₀ CFU/g at storage temperatures of 8°C, 10°C, and 12°C, and 1 log₁₀ CFU/g at temperatures of 16°C and 20°C. These values are lower than those obtained by Martin et al. (2013), who determined LoQ values of 3 log₁₀ CFU/g for *S. enterica* inoculated in cooked ham using the SYBR® Green and TaqMan® (PMA-qPCR) methods. Therefore, our results demonstrate the superior performance of the PMA-qPCR method for the quantification of *S. enterica* in processed meat products, highlighting the improved sensitivity of the PMA-qPCR method for the detection of this pathogen in food matrices.

Figure 4.1 Standard curve constructed by plotting the average Cq values for four PMA-qPCR runs for two independent amplifications against the cell concentration ($\log_{10}$ CFU/g) (determined by PC) of *Salmonella enterica* cocktail in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast (STB), stored at (a) 8°C, (b) 10°C, (c) 12°C, (d) 16°C, and (e) 20°C. The bold lines represent the linear fit, and the dotted lines represent the 95% confidence interval bands.



4.3.3 Comparative analysis of PC and PMA-qPCR methods

To compare the PC and PMA-qPCR methods, the correlation test with linear regression (95% CI) was employed (Fig. 4.2). For the *S. enterica* cocktail growth data at storage temperatures of 8°C, 10°C, 12°C, 16°C, and 20°C, an R^2 value of 0.99 was obtained, indicating a constant dispersion of data along the identity line (solid line). This demonstrates that the linear regression analysis revealed a statistically significant correlation (95% CI) between the PC and PMA-qPCR methods for the quantification of *S. enterica* cocktail in STB stored under isothermal temperature.

The comparison between conventional methods and the qPCR method is not limited to the use of the PC. Several other approaches can be employed, as exemplified by the study of Kim et al. (2017). The authors used the correlation method to compare the effectiveness of the conventional Most Probable Number (MPN) method combined with the qPCR method in quantifying *S. Typhimurium*, obtaining a R^2 value = 0.9335. However, while a good fit in linear regression is commonly used to compare two methods, linearity does not necessarily result in good agreement (Bland and Altman, 1986; Bunce, 2009; Clais et al., 2015). Therefore, the Bland-Altman analysis was used to assess the level of agreement between the two methods (Fig. 4.3).

Figure 4.2 Linear regression analysis of *Salmonella enterica* cells concentration (log₁₀ CFU/g) obtained by PC against *Salmonella enterica* cells concentration (log₁₀ CFU/g) obtained by PMA-qPCR methods in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast stored at 8 °C (□), 10 °C (○), 12 °C (◇), 16 °C (△) and 20 °C (*). Dotted lines represent the 95% confidence interval, and solid lines represent the fit of linear equation (presented with coefficients of determination, R^2).

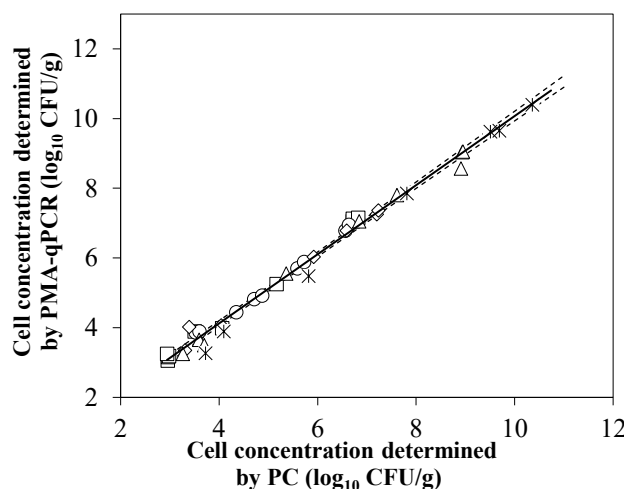
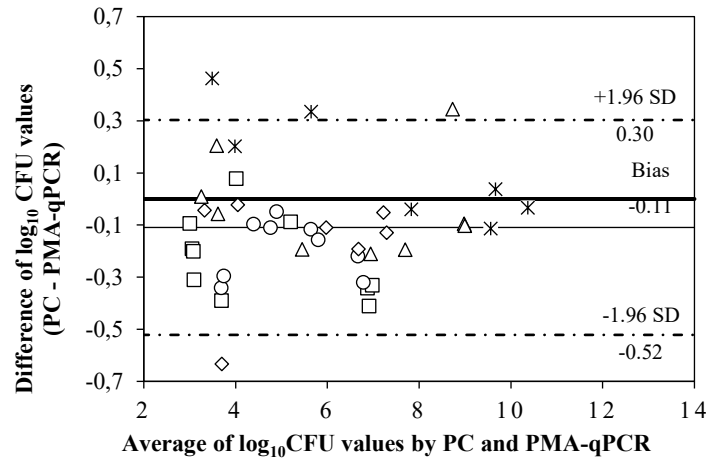


Figure 4.3 Bland-Altman analysis of agreement of *Salmonella enterica* cell concentration values ($\log_{10}$ CFU/g) obtained by PC and *Salmonella enterica* cell concentration obtained by PMA-qPCR methods in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast stored at 8 °C ($\square$), 10 °C ($\circ$), 12 °C ($\diamond$), 16 °C ($\triangle$), and 20 °C ($*$). The thin solid line represents the Bias (mean), while the standard deviations from the mean difference of $\log_{10}$ are represented as dashed lines. The solid bold line represents the zero line. SD: standard deviation.



The Bland-Altman analysis was used to assess the agreement between the data obtained by PC and PMA-qPCR methods. Fig. 4.3 shows that most of the data fell within the 95% CI limits (limits of agreement) of 0.30 to -0.52 $\log_{10}$ CFU/g. However, a mean difference (Bias) of -0.11 $\log_{10}$ CFU/g ($p < 0.05$) was observed, significantly indicating an underestimation by the PC method. This underestimation can be attributed to the presence of stressed or VBNC cells, detectable by PMA-qPCR but not by PC. This hypothesis is supported by the distribution of the data in the Bland-Altman plot (Fig. 4.3), where all points obtained at the more stressful temperatures for *Salmonella* spp. (8°C, 10°C, and 12°C) are positioned below the equality line (difference = 0) and close to the lower limit of agreement (-0.52 $\log_{10}$ CFU/g [$\log_{10}$ CFU/g (PC - PMA-qPCR)]). This observation suggests that VBNC cells, more prevalent under stress conditions, contribute to the underestimation by the PC method. Given this hypothesis, the PMA-qPCR count can be considered more accurate for quantifying the risk of *S. enterica* in STB, as it accounts for cells that, although in a VBNC state, still pose a health risk to consumers, especially in RTE products.

4.3.4 Primary modeling of *S. enterica* cocktail growth in STB using PC and PMA-qPCR methods.

The growth curves of a cocktail of three *S. enterica* serotypes in STB stored at 8°C, 10°C, 12°C, 16°C, and 20°C were obtained using the PMA-qPCR and PC methods (Fig. 4.4). The Baranyi model was separately fitted to the two sets of experimental growth data, with the

model parameters estimated using two step modeling (Baranyi et al., 1995). In the first step, the mean value ($\pm$ SD) for the parameter h_0 was calculated, resulting in $h_0 = 1.486 (\pm 0.97)$ (PMA-qPCR method) and $h_0 = 1.422 (\pm 1.32)$ (PC method). A comparable result was found by (Li et al., 2017) during the analysis of a *S. enterica* cocktail (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, and *S. Heidelberg*) in poultry products. They recorded an average h_0 value of 1.42 when applying the Baranyi model using the PC method, investigating storage temperatures between 10°C and 45°C. The values of h_0 depend on the physiological state of the cells and, in theory, should be equal for all conditions studied (considering the same microorganism, food, or culture medium) (Baranyi et al., 1995).

As observed in Figs. 4.4a and 4.4b, all growth curves shown a sigmoidal form for all temperatures studied (8°C to 20°C). This characteristic indicates that the Baranyi model was suitable for describing the growth of the *S. enterica* cocktail inoculated in STB for both quantification methods. The use of cocktail strains to develop predictive models can increase confidence in the model's ability to accurately predict the full range of environmental scenarios (Martins et al., 2020).

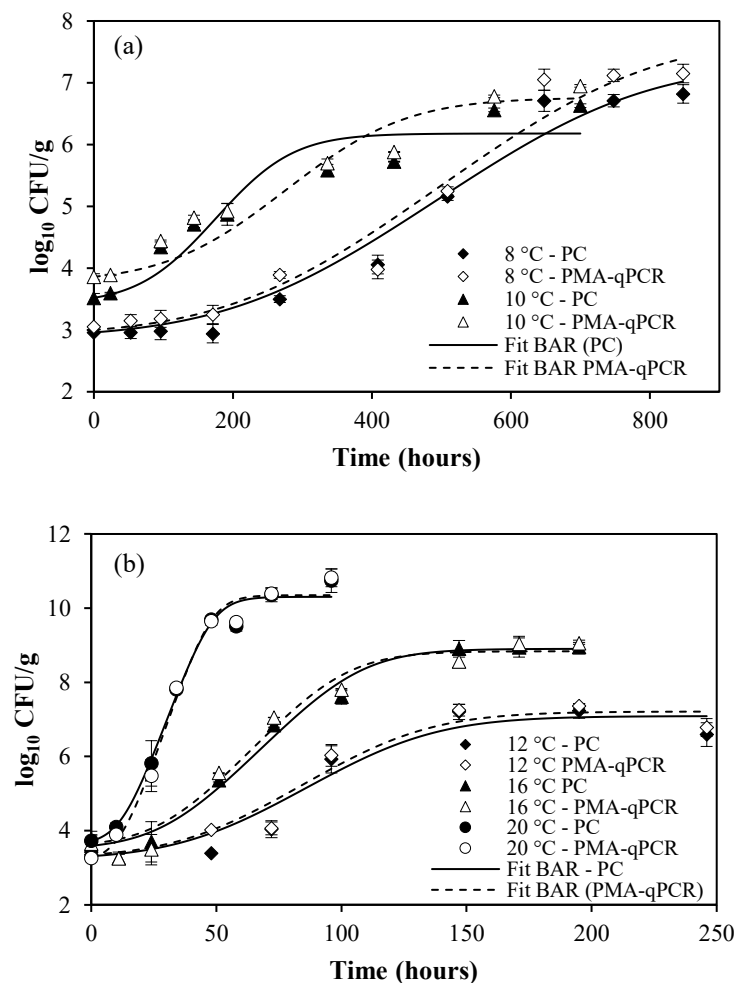
The initial counts of the inoculated samples in this study ranged from 2.96 to 3.72 log₁₀ CFU/g for PC method and from 3.05 to 3.86 log₁₀ CFU/g for PMA-qPCR method, considering all growth data. Fig. 4 shows the growth curves of *S. enterica* cocktail observed in STB stored at 8°C, 10°C, 12°C, 16°C, and 20°C for up to 35 days.

Tirloni et al. (2021) inoculated a cocktail of *S. enterica* (*S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*) in ricotta cheese (pH 6.06 and a_w 0.99) stored at 10°C. They found that at this temperature, the initial concentration of the *S. enterica* cocktail was 2.91 log₁₀ CFU/g, with a final concentration of 5.54 log₁₀ CFU/g, indicating an increase of 2.63 log₁₀ CFU/g. Similar results were found in this study, where, at 10°C, the *S. enterica* cocktail inoculated in STB (pH 6.18 and a_w 0.98) had an initial concentration of 3.52 log₁₀ CFU/g, and the increase in this concentration until the bacteria reached its stationary phase was 6.18 log₁₀ CFU/g, representing a growth of 2.66 log₁₀ CFU/g by the PC method. These results demonstrate that, despite being different foods, the *S. enterica* cocktails exhibited similar behavior under similar cultivation conditions, such as temperature, pH, and a_w values.

Noviyanti et al. (2018) studied the behavior of *S. Enteritidis* in chicken juice (pH 6.3 and a_w 0.99) stored at temperatures of 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, and 35°C, using the qPCR method. The results obtained at six different temperatures, through qPCR quantification, showed that the concentrations of *S. Enteritidis* cells ranged between 7.2 and 8.6 CFU/mL when they reached the stationary phase. These values are lower than those obtained in the present

study for the *S. enterica* cocktail by PMA-qPCR at the five isothermal temperatures studied (8°C to 20°C), where the variation ranged from 6.76 to 10.30 log₁₀ CFU/g. According to Monahan and Harry (2016) and (Podolak et al., 2010), specific characteristics of food materials can influence both the promotion and inhibition of *Salmonella* spp. growth. Additionally, the composition and pH of food can affect bacterial growth, whether in solid or liquid foods (Podolak et al., 2010). These factors may explain the differences observed between the results of Noviyanti et al. (2018) and the present study. It is worth noting that the present study used a cocktail of three *S. enterica* serotypes (*S. Heidelberg*, *S. Enteritidis*, and *S. Typhimurium*), whereas Noviyanti et al. (2018) studied only one serotype (*S. Enteritidis*).

Figure 4.4 Growth curves of *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham at (a) 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C quantified by plate count (PC, filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. The continuous and dashed lines indicate the fitting of Baranyi & Roberts (BAR) model to the experimental data obtained by PC and PMA-qPCR methods, respectively. The error bars represent the standard deviation of two independent experiments, each with two samples.



When analyzing refrigeration storage temperatures (8°C and 10°C), the PMA-qPCR method quantified a higher number of cells compared to the PC method. This behavior was also observed in the growth curves at 12°C and 16°C (temperature abuse). This higher number of cells was maintained during the latency phase, which can be attributed to the stress experienced by *S. enterica* during the adaptation phase to lower temperatures.

Throughout the growth kinetics, the concentrations in the other phases of the growth curve became closer between the methods. At the higher temperature (20 °C), *S. enterica* did not show many signs of stress, resulting in a lower concentration of VBNC and, consequently, in closer results between the PC and PMA-qPCR methods. Some authors suggest the use of PMA for a more accurate estimation of viable cells, mainly under stress conditions.

Luchansky et al. (2023) investigated the viability of *Salmonella* spp. in slices of German-style bologna containing mixtures of organic acid salts during storage at 4 °C or 12 °C. They observed a significant reduction in *Salmonella* spp. levels in four tested formulations of German-style bologna (approximately 1.6 – 2.3 log₁₀ CFU/slice reduction) from day 0 to day 90 of storage at 4 °C, both in bologna formulated with mixtures of organic acid salts and in bologna without these mixtures. In a similar study, Huang et al. (2011) found that *Salmonella* did not grow in cooked hams formulated with or without 1-3% sodium lactate when stored at 6 °C or 8 °C for up to 35 days. This suggests that *Salmonella* spp. may not be able to grow at temperatures below 8 °C.

The incorporation of PMA into the qPCR method in this study enabled the quantification of VBNC cells of *S. enterica*, providing more accurate data (compared to the PC method) on the concentration of this pathogenic bacterium, which is of great relevance to the food industry.

The increase in the temperature factor led to changes in behavior, showing that temperature directly influenced the development of this microorganism; thus, cold chain control is of fundamental importance. A better understanding of the behavior of *S. enterica* can be observed through the growth parameters obtained by fitting the Baranyi model to the experimental data obtained by PC and PMA-qPCR methods (Table 4.1).

Table 4.1 Growth parameters ($\pm 95\%$ confidence interval) estimated by of Baranyi and Roberts model (second step, fixed h_0) to the experimental data of *Salmonella enterica* cocktail in artificially inoculated cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast at 8 °C and 10 °C, and (b) 12 °C, 16 °C and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.

Method	T (°C)	Experimental value	BAR model parameters (h_0 fixed = 1.422 ± 1.32)		
		y_0 (log ₁₀ CFU/g)	μ_{max} (1/h)	λ (h)	y_{max} (log ₁₀ CFU/g)
PC	8	2.96 (± 0.03)	0.009 (± 0.001)	157.00 (± 1.19)	7.34 (± 0.98)
	10	3.52 (± 0.10)	0.021 (± 0.006)	69.11 (± 2.33)	6.18 (± 0.48)
	12	3.31 (± 0.06)	0.048 (± 0.014)	29.31 (± 1.32)	7.09 (± 0.87)
	16	3.59 (± 0.41)	0.073 (± 0.017)	19.49 (± 0.54)	8.90 (± 0.40)
	20	3.72 (± 0.37)	0.185 (± 0.019)	7.68 (± 0.11)	10.30 (± 0.49)
Method	T (°C)	Experimental value	BAR model parameters (h_0 fixed = 1.486 ± 0.97)		
		y_0 (log ₁₀ CFU/g)	μ_{max} (1/h)	λ (h)	y_{max} (log ₁₀ CFU/g)
PMA-qPCR	8	3.05 (± 0.03)	0.009 (± 0.001)	159.10 (± 3.29)	7.75 (± 1.28)
	10	3.86 (± 0.10)	0.014 (± 0.003)	110.56 (± 4.19)	6.76 (± 0.60)
	12	3.31 (± 0.07)	0.050 (± 0.012)	26.79 (± 1.09)	7.21 (± 0.73)
	16	3.65 (± 0.45)	0.076 (± 0.010)	19.57 (± 0.39)	8.84 (± 0.51)
	20	3.26 (± 0.06)	0.197 (± 0.020)	7.56 (± 0.11)	10.35 (± 0.52)

y_0 is the initial cell concentration fixed in the model, h_0 fixed is the arithmetic mean of the experiment.

The parameters estimated by the Baranyi model (λ , μ_{max} , and y_{max}) were influenced by the storage temperature. The lag phase (λ) and the maximum specific growth rate (μ_{max}) were the parameters that stood out the most. The values for parameter λ were 7.68 and 7.56 h when storage under abuse temperature (20°C) was observed for PC and PMA-qPCR methods, respectively. When the refrigeration temperature (8°C) was evaluated, the values for this parameter increased to 157.00 and 159.10 h for PC and PMA-qPCR methods, respectively. In all cases, the increase in temperature resulted in an increase in the parameter μ_{max} . In samples stored at 8°C, the observed μ_{max} value was 0.009 (1/h) for both PC and PMA-qPCR methods, while for the highest temperature studied (20°C), these values were 0.185 (1/h) and 0.197 (1/h) for the PC and PMA-qPCR methods, respectively.

Silva et al. (2020), in a study with a cocktail of *S. enterica* (*S. Minnesota*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, and *S. Enteritidis*) inoculated in uramaki sushi and stored at 20°C, obtained values of 0.17 (1/h) and 7 h for the parameters μ_{max} and λ , respectively. These values are similar to those found in this study for the *S. enterica* cocktail in STB stored at 20°C, where the values for these parameters were 0.189 (1/h) (μ_{max}) and 7.68 h (λ) by the PC method.

Recent studies demonstrate that the Baranyi model has been widely used to predict the behavior of *Salmonella* spp. in various refrigerated foods, such as sushi (7°C) (Silva et al., 2020), dairy products stored at 10.3°C (Tirloni et al., 2021), fresh vegetables (7°C) (Jung and Schaffner, 2021), and chicken meat stored at 8°C (Milkiewicz et al., 2020). This extensive usage

highlights that the Baranyi model stands out among primary models for predicting microbial growth in refrigerated foods.

4.3.5 Evaluation of the performance of the primary model for *S. enterica* cocktail

The statistical indices (R^2 , $RMSE$, A_f , and B_f) obtained by fitting the Baranyi model to the experimental data using the PMA-qPCR and PC methods at each studied temperature are presented in Table 4.2. The Baranyi model demonstrated satisfactory performance in fitting the experimental data, with average R^2 values of 0.957 (PC) and 0.954 (PMA-qPCR), close to 1.0. The average $RMSE$ values were 0.359 $\log_{10}$ CFU/g (PC) and 0.383 $\log_{10}$ CFU/g (PMA-qPCR), close to 0. Possas et al. (2017) chose the Baranyi model to describe the behavior of *S. Enteritidis* in RTE turkey products treated with thyme essential oil, obtaining R^2 values ranging from 0.95 to 0.98 by PC.

Table 4.2 Statistical indexes obtained by the fitting of Baranyi and Roberts model to the experimental data of *Salmonella enterica* cocktail in artificially inoculated cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast at 8, 10, 12, 16 and 20 °C obtained by PMA-qPCR and plate count (PC) methods.

Method	T (°C)	Experimental value	BAR model parameters		
		R^2	RMSE ($\log_{10}$ CFU/g)	A_f	B_f
PC	8	0.975	0.288	1.048	1.028
	10	0.904	0.381	1.054	0.988
	12	0.931	0.506	1.059	1.024
	16	0.988	0.288	1.039	1.017
	20	0.989	0.333	1.019	1.002
Method	T (°C)	Experimental value	BAR model parameters		
		R^2	RMSE ($\log_{10}$ CFU/g)	A_f	B_f
PMA-qPCR	8	0.963	0.343	1.051	1.003
	10	0.913	0.339	1.046	0.975
	12	0.934	0.436	1.040	1.010
	16	0.976	0.410	1.057	1.028
	20	0.986	0.387	1.690	0.967

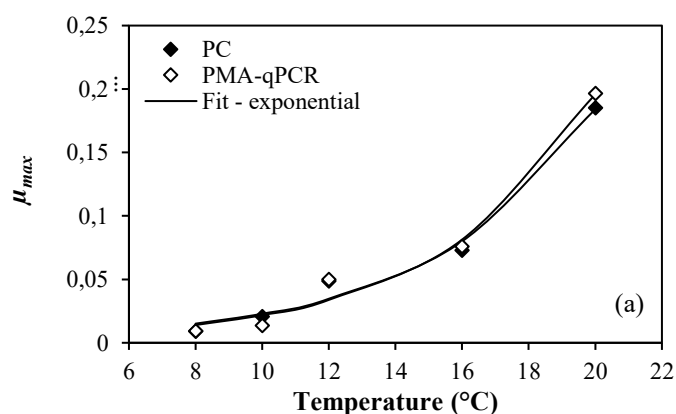
The performance of the model for the PMA-qPCR and PC methods was additionally evaluated through two factors: bias (B_f) and accuracy (A_f) (Table 4.2). The values of A_f and B_f remained close to 1.0, within an acceptable range, and met the criteria established by Ross (1996). For STB samples inoculated with *S. enterica* cocktail, the average values of A_f were 1.177 and 1.044 for the PMA-qPCR and PC methods, respectively, while the average values of B_f were 0.997 and 1.012 for the PMA-qPCR and PC methods, respectively. These results indicate that the adjustments of the Baranyi model neither underestimated nor overestimated

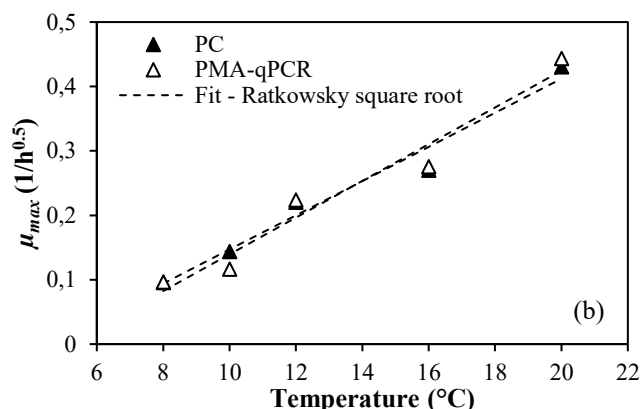
the observations of *S. enterica* cocktail growth by the PMA-qPCR and PC methods. This demonstrates that the fitting curves can accurately describe the growth of these bacteria in STB under isothermal storage.

4.3.6 Secondary modeling growth of *S. enterica* in STB using PC and PMA-qPCR methods

The maximum specific growth rate parameter (μ_{max}) estimated from the primary Baranyi model at each studied temperature was subsequently modeled as a function of temperature for the secondary Exponential (Eq. 4.6) and Ratkowsky Square Root model (Eq. 4.7) models as shown in Figs. 4.5a and 4.5b, respectively. The results indicated that, when inoculating STB with a *S. enterica* cocktail and storing it at isothermal temperatures ranging from 8°C to 20°C, the growth of the *S. enterica* cocktail occurred as expected, with a growth rate increasing with temperature.

Figure 4.5 Fitting of secondary models to describe the influence of temperature on μ_{max} parameter data of (a) *Leuconostoc mesenteroides* and (b) *Weissella viridescens* in sliced vacuum-packaged smoked turkey ham obtained by PC (filled symbols) and PMA-qPCR (unfilled symbols) methods. Continuous lines represent the fitting of Ratkowsky square root secondary model (circle symbols data, primary axis), and dashed line represents the fitting of exponential secondary model (symbols lozenge data, secondary axis).





The values of the parameters a , b , c , and T_{min} from the fitting of the secondary models were estimated (95% CI) through the secondary models, and statistical indices (R^2 and $RMSE$) were obtained (Table 4.3).

The results of the exponential secondary model better represented the temperature dependence of the μ_{max} parameter of the Baranyi model for the growth of *S. enterica* cocktail in STB than the results of the Ratkowsky square root model. With R^2 values ≥ 0.984 and $RMSE$ values ≤ 0.011 for both the PMA-qPCR and PC methods. Meanwhile, for the Ratkowsky square root model, the average R^2 value was 0.966, and the average $RMSE$ values were 0.029 for both the PMA-qPCR and PC methods.

In the study conducted by (Noviyanti et al., 2018), the Ratkowsky square root model was used to estimate the influence of temperature on the μ_{max} parameter for *S. Enteritidis* in chicken juice stored at six isothermal temperatures (10°C to 35°C). The resulting equation yielded R^2 and $RMSE$ values of 0.99 and 0.09, respectively. From this equation, approximate values for the parameter μ_{max} (values not provided in the original article) were obtained. The values found for temperatures of 10°C and 20°C (the same temperatures evaluated in the present study) were 0.0690 (1/h) and 0.2743 (1/h), respectively. In the present study, the values for this parameter under the same storage conditions were 0.0135 (1/h) for 10°C and 0.1965 (1/h) for 20°C. The difference between the two studies may be attributed to the initial concentration of *S. enterica* and the type of food. The composition and pH of the food can also affect bacterial growth, whether in solid or liquid foods (Podolak et al., 2010).

Table 4.3 Estimated parameter values ($\pm$ confidence interval) (a, b, c and Tmin) of the fitting of Exponential and Ratkowsky square root secondary models to $\mu_{\max}$ parameter values and the statistical indexes (R^2 and RMSE).

Methods	Secondary models			
	Exponential			
	a (1/h)	b (1/°C)	R^2	RMSE
PC	0.003 ($\pm$ 0.005)	0.209 ($\pm$ 0.093)	0.986	0.009
PMA-qPCR	0.002 ($\pm$ 0.005)	0.219 ($\pm$ 0.109)	0.984	0.011
Methods	Secondary models			
	Ratkowsky square root			
	c (1/ (°C $\sqrt{h}$))	T_{min} (°C)	R^2	RMSE
PC	0.027 ($\pm$ 0.012)	4.46 ($\pm$ 4.47)	0.971	0.026
PMA-qPCR	0.029 ($\pm$ 0.006)	5.11 ($\pm$ 4.78)	0.961	0.032

The predictive models developed in this study can be used to assess the potential growth of *S. enterica* in turkey products. This can be achieved by directly applying these models under the same temperature conditions in which they were developed or by validating existing predictive models (such as the Combase and Pathogen Modeling Program (PMP) databases), thus enabling their application across a wide range of temperatures.

The PMA-qPCR method emerged as a valuable tool for constructing the mathematical model. This DNA-based viability technique (PMA-qPCR) demonstrated high accuracy in quantifying the *S. enterica* cocktail, enabling the estimation of bacterial growth kinetics in STB under temperature conditions simulating a potential cold chain break in refrigerated meat products. This method is crucial for evaluating the behavior of pathogenic bacteria that are of great importance in food safety.

4.4 CONCLUSION

Currently, there are several techniques to detect *Salmonella enterica*, each one with its own advantages and limitations. Combining them in a standardized and coordinated manner can compensate for their deficiencies and provide more comprehensive reference methods. This study proposed integrating the PMA-qPCR method with predictive modeling to quantify the growth of a cocktail of three serotypes of *Salmonella enterica* at isothermal temperatures (8°C, 10°C, 12°C, 16°C, and 20°C), simulating a disruption in the cold chain and aiming at food

safety. This approach quantified the *Salmonella enterica* cocktail through cellular viability, distinguishing viable from non-viable cells compared to the conventional PC method. PMA-qPCR established standard curves with R^2 values of 0.99 and efficiency from 101% to 110%, with limits of LoQ between 1 log₁₀ CFU/g and 2 log₁₀ CFU/g, demonstrating high sensitivity. Comparative analysis revealed a significant correlation ($R^2 = 0.99$; 95% CI) between the PC and PMA-qPCR methods but the agreement analysis indicated an underestimation by the PC method. For example, PMA-qPCR quantified VBNC cells of *Salmonella enterica*, while PC failed to do so in samples stored at 8°C, 10°C, 12°C, and at some points at 16°C. Additionally, the developed models allowed for a more accurate prediction of the minimum growth temperatures of *Salmonella enterica* in cooked, sliced, and vacuum-packaged turkey breast. This precision is crucial for enhancing the safety of refrigerated meat products, enabling more accurate assessments of *Salmonella* risk and improvements in production, storage, and distribution processes. The findings of this study can inform the revision or enhancement of existing food safety guidelines. In summary, this research provides a solid foundation for the prevention and control of *Salmonella enterica* infections and food safety assurance.

Capítulo 5

5 MODELAGEM DA INTERAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E *SALMONELLA ENTERICA* EM PRESUNTO DE PERU EMBALADO A VÁCUO SOB CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS

5.1 INTRODUÇÃO

Os modelos de microbiologia preditiva são ferramentas valiosas para avaliar e gerir a segurança e a vida útil de alimentos, auxiliando, principalmente, em condições em que não existem dados (Oscar, 2009). Numerosos modelos de crescimento foram desenvolvidos para descrever o comportamento de *Salmonella* spp. em produtos cárneos (Dominguez; Schaffner, 2008; Juneja *et al.*, 2007; Oscar, 2009). No entanto, muitas vezes há vários tipos de bactérias que contaminam produtos cárneos, com crescimento concomitante. As BAL são deteriorantes dominantes em produtos cárneos prontos para consumo (RTE) (Diez *et al.*, 2009; Slongo *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2018; Dalcanton *et al.*, 2013), e *S. enterica* também é uma espécie de grande importância para segurança desses produtos (Franco; Landgraf, 2023). Durante o tempo de armazenamento, pode haver um efeito competitivo entre essas bactérias, influenciando o crescimento umas das outras.

Alguns modelos microbiológicos relacionados a mais de uma bactéria foram relatados, por exemplo, *Latilactobacillus sakei* e *Listeria monocytogenes* em filés de dourada (Costa *et al.*, 2019) e *Salmonella* spp. e a microbiota natural em frango moído (Jia *et al.*, 2020). No entanto, em presunto de peru defumado RTE, não há estudos relatados sobre modelos microbianos de interação de diferentes sorotipos de *S. enterica* com a presença de BAL dominantes, como *L. mesenteroides* e *W. viridescens*. Além disso, o método de PMA-qPCR, conforme já descrito nos Capítulos 3 e 4, pode ser utilizado como uma ferramenta analítica para diferenciar o crescimento das duas espécies de BAL em co-cultivo com *S. enterica*.

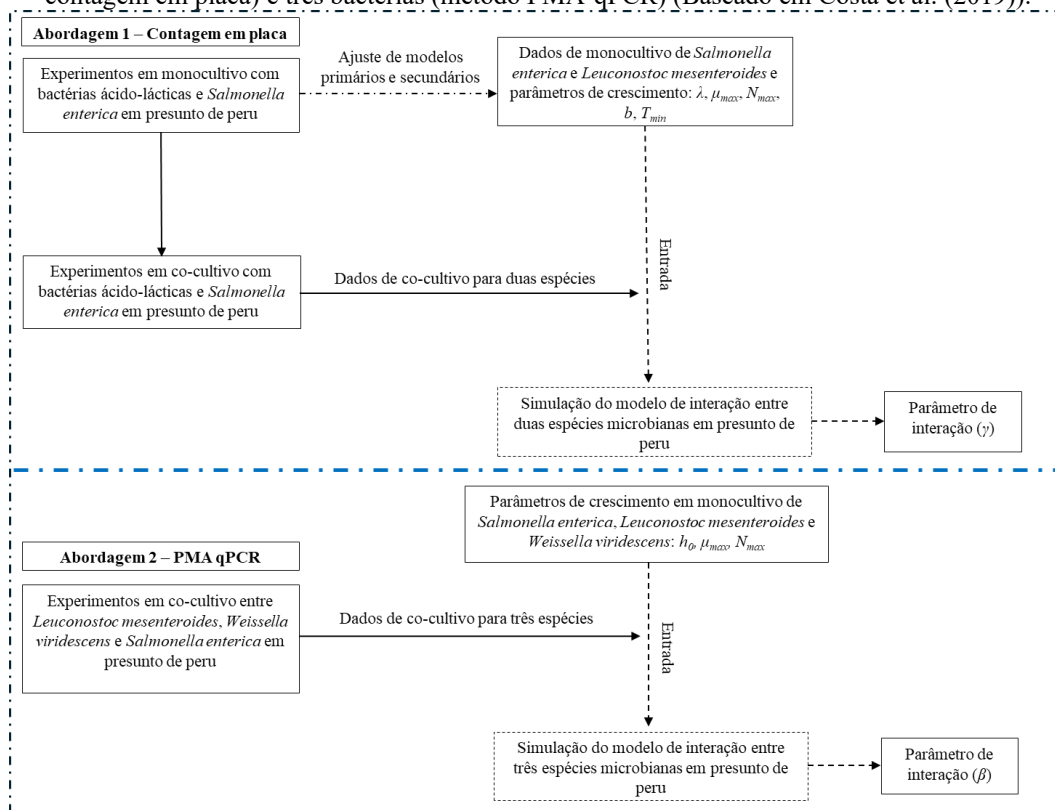
Diante desse contexto, no Capítulo 5 foram realizadas modelagens matemáticas para investigar a interação entre *S. enterica*, *W. viridescens* e *L. mesenteroides* em presunto de peru fatiado e embalado a vácuo. A modelagem foi utilizada com duas abordagens (2 ou 3 bactérias) com base em dados obtidos através dos métodos de contagem em placa (CP) (2 bactérias) e PMA-qPCR (3 bactérias).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Modelagem para o estabelecimento de modelos de interação microbiana

Foram utilizados modelos de interação para simular o crescimento em co-cultivo de bactérias ácido-láticas (BAL) e *S. enterica* em presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo, sob diferentes temperaturas de armazenamento isotérmicas. As simulações foram divididas com base no número de tipos de bactérias que era possível identificar em co-cultivo, baseadas nos métodos de quantificação dos microrganismos: 1) modelo de interação do crescimento de dois tipos de bactéria: tipo 1- contagem total de BAL (CTB), incluindo *L. mesenteroides* e *W. viridescens* (esse método não permite a diferenciação das espécies), e tipo 2 - sorotipos de *S. enterica*, quantificadas por contagem em placa (CP) e 2) modelo de interação do crescimento de três tipos de bactéria: tipo 1 - *L. mesenteroides*, tipo 2 - *W. viridescens* e tipo 3 - *S. enterica*, quantificadas por PMA-qPCR. Uma visão geral esquemática do método passo a passo é apresentada na Figura 5.1.

Figure 5.1 Visão geral esquemática da obtenção dos parâmetros de interação entre duas bactérias (método de contagem em placa) e três bactérias (método PMA-qPCR) (Baseado em Costa et al. (2019)).



Em ambas as abordagens, os parâmetros cinéticos primários, como fase lag (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), estado fisiológico da célula (h_0) e densidade populacional máxima (N_{max}), foram obtidos a partir de dados experimentais em monocultivo em presunto de peru, sob diferentes condições de temperatura, utilizando o modelo de Baranyi e Roberts, conforme descrito na Seção 3.2.8.1.

Para simular a interação da contagem total de bactérias ácido-láticas (CTB) em co-cultivo com *S. enterica* (2 tipos de bactérias), foram utilizados dados de monocultivo de *L. mesenteroides* quantificados por contagem em placa (CP). Ou seja, a CTB, que representa duas bactérias, foi considerada 1 bactéria e representada pelos dados de *L. mesenteroides* em monocultivo. Isso se deve ao crescimento dominante de *L. mesenteroides* em relação a *W. viridescens* em co-cultivo, às temperaturas de 8 °C e 30 °C, conforme demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Martins *et al.*, 2024; Severo, 2018) e pelos resultados apresentados nas próximas seções deste trabalho. Com base nos parâmetros cinéticos obtidos da modelagem primária, foram gerados modelos secundários utilizando a equação da raiz quadrada para prever a influência da temperatura sobre os parâmetros λ e μ_{max} .

Na abordagem com 3 bactérias, para que fosse possível quantificar cada uma de forma individual em co-cultivo, foi utilizado o método PMA-qPCR que é capaz de realizar esta diferenciação celular. Desta maneira, foi possível modelar matematicamente a interação das três espécies entre si e avaliar se houve e de que maneira houve competição entre as bactérias *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* em cinco temperaturas diferentes (8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C)

5.2.2 Microrganismos e preparo do inóculo

5.2.2.1 Preparo do coquetel de *L. mesenteroides* e *W. viridescens*

Neste estudo, foram utilizadas dez cepas diferentes de duas espécies de BAL. Entre elas, estavam duas cepas de referência: *L. mesenteroides* ATCC 8293TM e *W. viridescens* ATCC 12706TM. Além disso, seis cepas foram isoladas de *morcilla* por Diez *et al.* (2009): *L. mesenteroides* L1, L8 e L35, e *W. viridescens* W1, W8 e W35. Outras duas cepas, *L. mesenteroides* 66 e *W. viridescens* 132, foram isoladas de *morcilla* por Santos *et al.* (2005).

Para preparar os inóculos de *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, 100 μ L de suspensões de cada espécie foram descongelados e transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo MRS.

As suspensões foram incubadas a 30 °C por 24 horas e subcultivadas no dia seguinte. A subcultura foi cultivada por 18 horas até atingir a fase estacionária de crescimento, alcançando uma concentração de 10^9 UFC/mL. Em seguida, foram preparados dois coquetéis de cada espécie (5 cepas de *W. viridescens* e 5 cepas de *L. mesenteroides*), combinando partes iguais das suspensões padronizadas para produzir uma mistura de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

5.2.2.2 Preparo do coquetel de *Salmonella enterica*

Três distintos sorotipos de *S. enterica* foram utilizados neste estudo: duas cepas de referência *S. Typhimurium* ATCC 14028™ e *S. Enteritidis* ATCC 13046™, além de uma cepa de *S. Heidelberg* isolada de uma planta de processamento avícola em Santa Catarina, Brasil.

Todas as cepas de *S. enterica* foram cultivadas em caldo Brain-Heart Infusion (BHI) (Kasvi®, Brasil) por 24 horas a 37 °C. Este passo visa garantir a viabilidade e a atividade metabólica das células bacterianas para uso subsequente nos experimentos. Após a incubação, suspensões individuais de cada cepa foram congeladas a -80 °C em caldo BHI contendo 30% de glicerol para preservação.

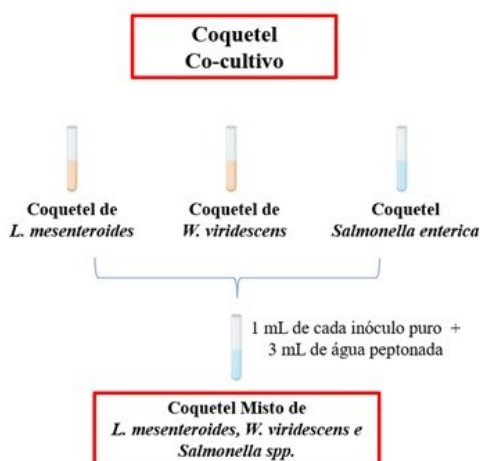
Para preparar o inóculo, 100 µL das suspensões congeladas foram descongelados e inoculados em tubos separados contendo 10 mL de caldo BHI fresco. Após a incubação, 0,1 mL de cada cultura foi plaqueado em Ágar Violet Red Bile Glucose (VRBG - Kasvi®, Brasil). Uma única colônia de cada placa de VRBG foi selecionada e transferida para um novo tubo contendo 5 mL de caldo BHI. Este passo visa isolar uma única célula bacteriana, garantindo a pureza da cultura e a homogeneidade da população microbiana para análises subsequentes. A cultura foi incubada com agitação a 210 rpm por 24 horas a 37 °C. Após a incubação, a cultura foi subcultivada por mais 18 horas. Após a subcultura, as culturas foram centrifugadas a 380 rpm ($16 \times g$) por 7 minutos. Diluições padronizadas foram preparadas utilizando água peptonada. Um coquetel contendo volumes iguais de cada suspensão padronizada foi preparado em caldo água peptonada, resultando em um inóculo combinado com uma concentração estimada de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL. O inóculo combinado permite a avaliação do efeito de todos os sorotipos de *S. enterica* simultaneamente nos experimentos.

5.2.2.3 Preparo do coquetel da cultura mista

Para preparar um inóculo misto, volumes iguais de cada suspensão pura derivada dos inóculos individuais (*L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica*) foram combinados em

água peptonada. A concentração final da suspensão mista foi estimada em 10^7 UFC/mL (Figura 5.2).

Figura 5.2 Ilustração do modo de preparo do coquetel de cultura mista de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica*.



Fonte: elaborada pela autora (2024)

5.2.2.4 Preparo das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram adquiridas no comércio local, peças inteiras de presunto de peru defumado com data de fabricação inferior a 15 dias e armazenadas a 4 °C. Após a abertura da embalagem, a superfície das peças foram tratadas com etanol 70% para eliminar a microbiota contaminante natural, como descrito por Menezes *et al.* (2018) e, em seguida, as peças foram fatiadas assepticamente em câmara de fluxo, utilizando um fatiador de frios (Metvisa, CFIE 250), com espessura de 1,5 mm. O fatiador e os utensílios utilizados neste processo foram previamente higienizados com álcool 70% e submetidos à luz UV por cerca de 30 minutos (Figura 5.3).

Figura 5.3 Fatiador e utensílios utilizados no fatiamento de presunto de peru defumado.



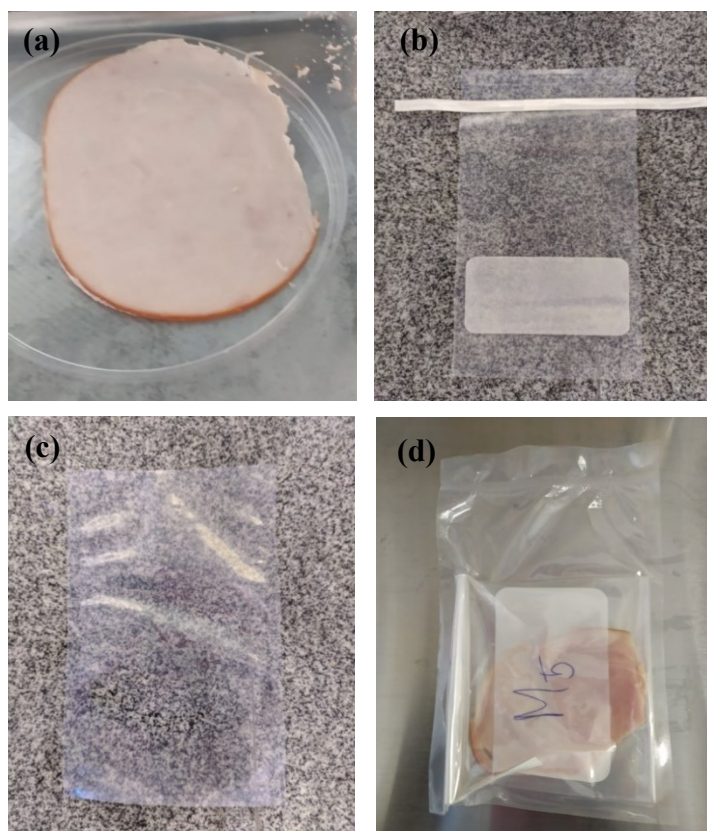
Fonte: elaborada pela autora (2024)

5.2.2.5 Fatias de presunto de peru defumado inoculado artificialmente

Para o preparo das amostras inoculadas artificialmente, fatias de presunto de peru defumado (peso médio de 14 g) foram inoculadas com 100 μ L de coquetel contendo, aproximadamente, 10^6 UFC/mL de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica*, para que as amostras de presunto de peru defumado e fatiado apresentassem uma concentração aproximada de 10^3 UFC/g e, em seguida, embaladas a vácuo. Para as fatias de presunto de peru defumado, fatiado e embalado a vácuo (PPF) sem inóculo foram adicionados 100 μ L de água estéril. A contagem inicial das cepas foi determinada pelo método de CP, utilizando os meios MRS e VRBG para as BAL e *S. enterica*, respectivamente.

As amostras foram adicionadas, individualmente, em duas embalagens, sendo a embalagem primária (contato direto com a amostra) de plástico, estéril, livre de DNase/RNase e com capacidade de 540 mL. A embalagem foi dobrada, lacrada por meio de um feixe e, em seguida, depositada dentro da embalagem secundária para alimentos refrigerados e embalados a vácuo. A embalagem secundária foi, então, selada a vácuo na seladora (CETRO, DZ-260C) (Figura 5.4), em seguida as amostras foram submetidas a diferentes condições de temperatura de armazenamento (8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C).

Figura 5.4 Fatia de presunto de peru suas respectivas embalagens primária e secundária. (a) Fatia de presunto de peru, (b) embalagem primária, (c) embalagem secundária e (d) presunto de peru fatiado em embalado a vácuo.



Fonte: elaborada pela autora (2024)

5.2.2.6 Condições de armazenamento

As amostras de PPF foram armazenadas às temperaturas isotérmicas de 8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C. A faixa de temperatura foi selecionada com a finalidade de se estudar a importância da temperatura na cadeia de frio, para avaliação da vida útil de produtos cárneos embalados a vácuo. A temperatura dentro do ambiente refrigerado foi registrada por mini *data-logger* (TESTO, 174 H).

5.2.2.7 Quantificação de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* em PPF

Para quantificação do crescimento de *L. mesenteroides*, de *W. viridescens* e de *S. enterica*, fatias de aproximadamente 14 g foram misturadas em água peptonada com volume proporcional de amostra e água peptonada de (1: 9) em saco de plástico estéril (livre de DNase/RNase) e maceradas num processo manual por cerca de 60 s. Diluições decimais em água peptonada foram preparadas para análise microbiológica e alíquotas de 100 µL das

diluições foram semeadas em superfície de Ágar MRS para quantificação de *L. mesenteroides* e de *W. viridescens* e, em seguida, incubadas em BOD a 30 °C por 48 h. Para a quantificação de *S. enterica*, as diluições foram semeadas em superfície de Ágar VRBG (VRBG - Kasvi®, Brazil e incubadas a 37 °C por 24 h.

5.2.2.8 Curvas de crescimento por contagem em placas

Para obtenção das curvas de crescimento do coquetel misto por este método foram realizadas as quantificações da contagem total das BAL (CTB), *W. viridescens* e *L. mesenteroides*, em cultura mista, sem identificação da espécie. Para *S. enterica* a quantificação foi realizada em meio específico como reportado no item 5.2.7. A média da contagem de UFC/g (e desvio padrão) de duas amostras independentes de cada amostragem (retiradas em intervalos de tempo pré-determinados de acordo com a temperatura estudada) de cada ponto da curva de crescimento foi calculada e utilizada para determinar a cinética de crescimento.

5.2.2.9 Curvas de crescimento por PMA-qPCR

Para quantificação de *L. mesenteroides*, de *W. viridescens* e de *S. enterica*, por PMA-qPCR, 500 µL de cada amostra foi retirado em microtubos livres de DNase/RNase, para realização dos ensaios de PMA-qPCR e foi realizado o pré-tratamento com PMAxx™, conforme descrito na seção 3.2.7.1 do Capítulo 3.

O DNA genômico das amostras de PPF foi extraído em duplicata a partir de suspensões tratadas com PMAxx™. Após a centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 minutos, o DNA genômico foi isolado utilizando o kit DNeasy® PowerFood® Microbial (Qiagen, Reino Unido), conforme as instruções do fabricante.

As condições dos ensaios de PMA-qPCR foram realizados conforme já descrito na seção 3.2.7.3 do Capítulo 3 para *L. mesenteroides* e *W. viridescens* e de acordo com a seção 4.2.6.3 do Capítulo 4 para *S. enterica*. As curvas padrão já obtidas anteriormente nos capítulos 3 e 4 foram utilizadas para correlacionar os valores de C_q com os valores de $\log_{10}$ UFC/g. Dessa forma, serão obtidos os valores das concentrações em $\log_{10}$ UFC/g por PMA-qPCR, para as espécies *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* em cocultivo.

5.2.3 Modelagem da interação do crescimento de *L. mesenteroides* e *S. enterica* em monocultivo por CP (Abordagem com 2 tipos de bactéria)

Cornú et al. (2001) propôs um modelo de interação baseado na hipótese de que as desacelerações de duas populações seriam simultâneas e resultariam da competição por um recurso limitante comum. Tais observações foram feitas aproximadamente 40 anos antes por Jameson (1962). Houve um grande intervalo entre as observações de Jameson e a introdução desses conceitos na Microbiologia Preditiva por Ross; McMeekin; Baranyi (2000), que propuseram chamar esse fenômeno como Efeito Jameson.

Esta desaceleração simultânea é, portanto, um princípio muito básico e permite a modelagem de culturas mistas com modelos que utilizam a interação de uma espécie em outra. Esses novos modelos foram alcançados através de uma modificação do modelo genérico de crescimento primário. No presente trabalho, modelos de interação baseados no efeito Jameson (Equações 5.1 e 5.2) foram utilizados para ajustar os dados e estimar os parâmetros cinéticos correspondentes em condições de co-cultivo. Além disso, o uso de modificações no modelo de efeito Jameson foi proposto para permitir estimar o comportamento do patógeno (crescimento/não crescimento) após a cepa de BAL atingir a fase estacionária. Nesse sentido, o uso do parâmetro de interação γ permite a quantificação do efeito inibitório da cepa de BAL sobre o crescimento de *S. enterica* em função da temperatura (Cadavez *et al.*, 2019; Cornú *et al.*, 2011; Giménez; Dalgaard, 2004; Møller *et al.*, 2013). O modelo relaciona a variação das concentrações das duas espécies com o tempo com fatores específicos de cada uma das espécies, como a velocidade máxima de crescimento, μ_i^{max} e concentração máxima da espécie, N_i^{max} . O subscrito *SM* representa *S. enterica* e *BAL* indica a *L. mesenteroides*, quantificados por contagem em placa (CP). Essa abordagem é justificada pelo crescimento dominante de *L. mesenteroides* em relação a *W. viridescens* em co-cultivo.

$$\frac{dN_{BAL}}{dt} = N_{BAL} * \mu_{BAL}^{max} \left(1 - \frac{N_{BAL}}{N_{BAL}^{max}} \right) \quad (5.1)$$

$$\frac{dN_{SM}}{dt} = N_{SM} * \mu_{SM}^{max} \left(1 - \frac{N_{SM}}{N_{SM}^{max}} \right) \left(1 - \frac{\gamma * N_{BAL}}{N_{BAL}^{max}} \right) \quad (5.2)$$

Os parâmetros necessários para o desenvolvimento do modelo, bem como as concentrações iniciais de ambas as espécies para cada uma das temperaturas estudadas (8 °C,

10 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C) estão descritos na Tabela 5.1 A resolução deste sistema de duas equações diferenciais foi desenvolvida em um solver no Microsoft Excel.

Tabela 5.1 Parâmetros de crescimento estimados pelo modelo secundário da raiz quadrada a partir do método de contagem em placa (log UFC/g) para *L. mesenteroides* (seções 3.3.4) e *S. enterica* (seções 4.3.7) em monocultivo, obtidos a partir do modelo de Baranyi e Roberts em peito de peru armazenado a 8, 10, 12, 16 e 20 °C, sem considerar a interação entre os dois microrganismos

Temp (°C)	N ₀ (LM) ^a UFC/g	N ₀ (SM) ^b UFC/g	<i>L. mesenteroides</i>			<i>Salmonella enterica</i>		
			λ (h)	μ _{max} (h ⁻¹)	N _{max} (log ₁₀ UFC /g)	λ (h)	μ _{max} (h ⁻¹)	N _{max} (log ₁₀ UFC /g)
8	3,22	3,11	18,32	0,2689	11,82	109,11	0,0939	^c SC
10	3,29	3,66	14,41	0,3398	11,80	81,02	0,1469	^c SC
12	3,02	4,41	10,96	0,4108	11,80	57,09	0,2000	5,68
16	3,33	3,45	5,49	0,5526	11,80	21,77	0,3061	6,21
20	3,50	3,33	1,89	0,6912	11,69	3,15	0,4121	7,25

^a N₀ (LM), concentração inicial para *L. mesenteroides*,

^b N₀ (SM), concentração inicial para *Salmonella*,

^c SC, sem crescimento observado.

5.2.4 Modelagem da interação do crescimento de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* em co-cultivo por PMA-qPCR (abordagem com 3 bactérias)

Para a representação da interação entre três espécies, um modelo foi desenvolvido baseado nos modelos de (Powell; Schlosser; Ebel, 2004) e Dens *et al.* (1999) e levou em consideração o efeito Jameson. O modelo é um sistema de equações diferenciais das variações das concentrações das espécies N_i com o tempo, em função de suas velocidades máximas de crescimento μ_i^{max} , do estado fisiológico das células $h_{0,i}$, das máximas concentrações das espécies N_i^{max} e dos fatores de competição interespecíficos β_{ij} (Blanco-Lizarazo; Sotelo-Díaz; Llorente-Bousquets, 2016). No modelo (Equações 5.3, 5.4 e 5.5), representado por um sistema de três equações diferenciais, os subscritos *WV*, *LM* e *SM* correspondem à *W. viridescens*, *L. mesenteroides*, e *S. enterica*, respectivamente.

$$\frac{dN_{WV}}{dt} = \mu_{WV}^{max} N_{WV} \left(\frac{h_{0WV}}{1+h_{0WV}} \right) \left(1 - \frac{N_{WV} + (\beta_{WV} N_{LM}) + (\beta_{WV} N_{SM})}{N_{WV}^{max}} \right) \quad (5.7)$$

$$\frac{dN_{LM}}{dt} = \mu_{LM}^{max} N_{LM} \left(\frac{h_{0LM}}{1+h_{0LM}} \right) \left(1 - \frac{N_{LM} + (\beta_{LM} N_{WV}) + (\beta_{LM} N_{SM})}{N_{LM}^{max}} \right) \quad (5.8)$$

$$\frac{dN_{SM}}{dt} = \mu_{SM}^{max} N_{SM} \left(\frac{h_{0SM}}{1+h_{0SM}} \right) \left(1 - \frac{N_{SM} + (\beta_{SM} N_{WV}) + (\beta_{SM} N_{LM})}{N_{SM}^{Max}} \right) \quad (5.9)$$

Este sistema de três equações diferenciais foi resolvido no MATLAB, por meio das funções *ode45* e *lsqcurvefit*, as quais estimaram os seis valores dos fatores de competição interespecíficos β_{ij} , referentes às interações entre cada uma das três bactérias entre si. Para isso, o modelo foi alimentado com dados experimentais obtidos pelo cultivo e crescimento das três bactérias em presunto de peru fatiado, cujas concentrações ao longo do tempo foram quantificadas pelo método PMA-qPCR e realizadas em cinco temperaturas diferentes: 8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C. Os parâmetros obtidos em monocultivo (μ^{max} , h_0 e N^{max}) e as concentrações iniciais para cada uma das três bactérias e para as cinco temperaturas estudadas estão descritos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Parâmetros de crescimento estimados (resultados dos capítulos 3 e 4) a partir do método de PMA-qPCR (log UFC/g) para *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* em monocultivo, obtidos a partir do modelo de Baranyi e Roberts em peito de peru armazenado a 8, 10, 12, 16 e 20 °C, sem considerar a interação entre os três microrganismos.

Bactéria	T (°C)	Dados experimentais (h_0 fixo = 1,49 ± 0,97)		
		N_0 (log ₁₀ UFC /g)	μ_{max} (1/h)	N_{max} (log ₁₀ UFC /g)
<i>Salmonella enterica</i>	8	3,05 (± 0,03)	0,009 (± 0,001)	7,75 (± 1,28)
	10	3,86 (± 0,10)	0,014 (± 0,003)	6,76 (± 0,60)
	12	3,31 (± 0,07)	0,050 (± 0,012)	7,21 (± 0,73)
	16	3,65 (± 0,45)	0,076 (± 0,010)	8,84 (± 0,51)
	20	3,26 (± 0,06)	0,197 (± 0,020)	10,35 (± 0,52)
Bactéria	T (°C)	Dados experimentais (h_0 fixo = 1,37 ± 0,41)		
		N_0 (log ₁₀ UFC /g)	μ_{max} (1/h)	N_{max} (log ₁₀ UFC /g)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	8	3,35 (± 0,08)	0,059 (± 0,004)	10,25 (± 0,71)
	10	3,42 (± 0,15)	0,112 (± 0,009)	11,30 (± 0,63)
	12	3,32 (± 0,15)	0,142 (± 0,011)	9,60 (± 0,07)
	16	3,38 (± 0,02)	0,394 (± 0,083)	10,34 (± 1,03)
	20	3,62 (± 0,03)	0,416 (± 0,049)	11,48 (± 0,95)
Bactéria	T (°C)	Dados experimentais (h_0 fixo = 1,54 ± 0,28)		
		N_0 (log ₁₀ UFC/g)	μ_{max} (1/h)	N_{max} (log ₁₀ UFC /g)
<i>Weissella viridescens</i>	8	3,25 (± 0,34)	0,061 (± 0,008)	0,061 (± 0,008)
	10	3,15 (± 0,10)	0,108 (± 0,015)	0,108 (± 0,015)
	12	3,32 (± 0,09)	0,130 (± 0,018)	0,130 (± 0,018)
	16	3,43 (± 0,23)	0,260 (± 0,029)	0,260 (± 0,029)
	20	3,32 (± 0,07)	0,362 (± 0,025)	0,362 (± 0,025)

O modelo para cada bactéria, que é dependente dos modelos das outras duas bactérias, foi desenvolvido para cada uma destas cinco temperaturas. Para avaliar predição dos modelos aos dados experimentais, foi utilizado o índice RMSE (*Root Mean Square Error*), cuja utilização se dá tanto em modelos lineares quanto em não-lineares.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Modelagem do crescimento de *L. mesenteroides* e *S. enterica* em PPF em mono e co-cultivo – (abordagem considerando 2 tipos de microrganismos)

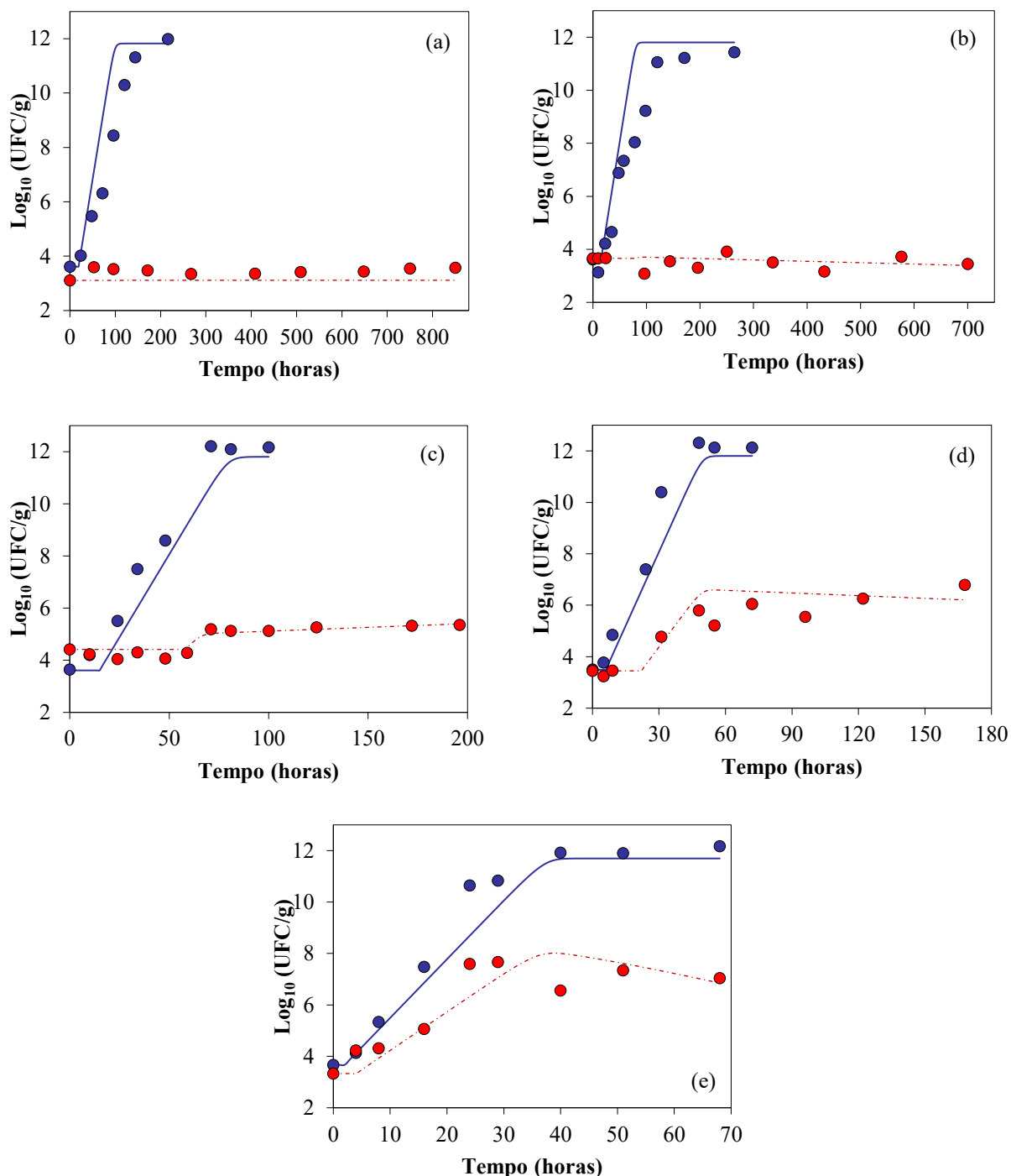
Com base no crescimento em monocultivo de *L. mesenteroides* e *S. enterica* em PPF, descrito nos Capítulos 3 e 4, respectivamente, verificou-se que ambas as bactérias demonstraram boa capacidade de crescimento em presunto de peru armazenado tanto em temperaturas de refrigeração quanto em temperaturas abusivas, nas condições de monocultivo. Dessa forma, os valores dos parâmetros $\mu_{m\acute{a}x}$ e λ , em monocultivo, previstos pelo modelo secundário da raiz quadrada foram utilizados para estimar a interação dessas bactérias em co-cultivo.

O método de contagem em placa (CP) foi empregado para quantificar o crescimento em co-cultivo de *S. enterica*, *L. mesenteroides* e *W. viridescens*. No entanto, esse método não permitiu diferenciar o crescimento das BAL *L. mesenteroides* e *W. viridescens*, pois as colônias em ágar MRS são morfologicamente semelhantes. Assim, a curva de crescimento das BAL em co-cultivo foi designada como contagem total de bactérias ácido-láticas (CTB). Conforme abordado por Martins *et al.* (2024), *L. mesenteroides* foi a BAL dominante em condições de co-cultivo com *W. viridescens* à temperatura de 8 °C, quantificada por SYBR® Green qPCR. Além disso, os autores observaram que o crescimento de cada espécie em co-cultivo foi superior ao observado em monocultivo, sugerindo um efeito levemente sinérgico entre as duas espécies. Esse efeito também foi relatado por Diez *et al.* (2009) ao inocularem *W. viridescens*, *L. mesenteroides* e o co-cultivo dessas duas espécies em salsicha de sangue. Os autores notaram que o crescimento de *W. viridescens* foi mais lento que o de *L. mesenteroides*, seja inoculado separadamente ou em conjunto, e que um possível efeito sinérgico ocorreu em co-cultivo, como também confirmado por Vermeiren *et al.* (2005) em amostras de presunto cozido inoculadas com essas espécies.

Baseando-se nessas informações, a simulação da interação da contagem total de bactérias ácido-láticas (CTB) em co-cultivo com *S. enterica* foi realizada utilizando os dados de monocultivo de *L. mesenteroides* quantificados por contagem em placa (CP).

O crescimento de BAL e *S. enterica* em co-cultivo em PPF armazenado em diferentes temperaturas é mostrado na Figura 5.5.

Figura 5.5 Dados experimentais observados e simulações obtidas pelo modelo preditivo baseado no Efeito Jameson modificado (Cadavez *et al.*, 2019; Cornú *et al.*, 2011; Giménez; Dalgaard, 2004; Møller *et al.*, 2013) para contagem total de bactérias ácido-láticas (CTB) (●) e *S. enterica* (●) em presunto de peru armazenado em condições isotérmicas: (a) 8 °C, (b) 10 °C, (c) 12 °C, (d) 16 °C, (e) 20 °C. Linhas tracejadas vermelha representam as simulações para as cepas de *S. enterica* e linhas sólidas azuis representam as simulações para *L. mesenteroides*.



As concentrações de CTB em PPF reduziram o crescimento de *S. enterica*, e esse efeito foi dependente da temperatura. Em todas as temperaturas analisadas (8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C

e 20 °C), o crescimento de *S. enterica* foi ausente ou atenuado devido à presença das BAL, resultando no efeito Jameson (Figura 5.5). No entanto, observou-se que em temperaturas de armazenamento mais baixas (8 °C e 10 °C), a inibição do crescimento de *S. enterica* foi mais pronunciada em comparação com temperaturas mais elevadas (12 °C, 16 °C e 20 °C). Isso indica que a temperatura é um fator crucial na determinação do nível de inibição do patógeno. Esse fenômeno também foi descrito para a interação entre outros patógenos, como *L. monocytogenes* e as BAL deteriorantes (Mellefont et al., 2008; Serra-Castelló et al., 2022).

De acordo com o modelo expandido do efeito Jameson, o comportamento de *S. enterica* depende dos valores de γ : a bactéria pode crescer após *L. mesenteroides* atingir sua população máxima ($N_{\max}$) se γ for menor que 1, ou diminuir se γ for maior que 1. Quando γ é igual a 1, *S. enterica* é inibida. Neste estudo, os valores de γ determinados foram 1,0, 1,01, 0,97, 1,03 e 1,26 (Tabela 5.3) para as temperaturas de 8 °C, 10 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C, respectivamente. Esses resultados indicam que houve inibição de *S. enterica* a 8 °C e 10 °C ($\gamma = 1$), um pequeno crescimento a 12 °C após 60 horas de co-cultivo ($\gamma < 1$), e inibição de *S. enterica* a 16 °C e 20 °C ($\gamma > 1$) após *L. mesenteroides* atingir seu $N_{\max}$. Esses resultados corroboram os achados de Møller *et al.* (2013), que observaram que altas concentrações da microbiota natural em carne suína crua moída reduziram o crescimento de *Salmonella* spp., com esse efeito sendo dependente da temperatura. Os autores verificaram que, nas temperaturas de 9,4 °C, 10,4 °C, 11,9 °C e 14,2 °C, o crescimento de *Salmonella* spp. não foi observado ou foi atenuado pela microbiota natural, conforme o efeito Jameson.

Tabela 5.3 Estimativa do fator de interação (γ) do modelo de efeito Jameson modificado e índice de qualidade do ajuste (RMSE) para *Leuconostoc mesenteroides* e *Salmonella enterica* em co-cultura em presunto de peru fatiado, embalado a vácuo, armazenados em condições isotérmicas.

Temperatura (°C)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		<i>Salmonella enterica</i>		γ
	n ^a	RMSE	n ^a	RMSE	
8	8	1,7132	10	0,3665	1,00
10	11	1,5948	11	0,2892	1,01
12	8	0,4518	12	1,9900	0,97
16	8	0,9617	10	0,7360	1,03
20	9	0,8400	9	0,7999	1,26

^a Número de dados experimentais de *Leuconostoc mesenteroides* e *Salmonella enterica*.

O modelo de efeito Jameson apresentou a pior performance para os dados de *L. mesenteroides* nas temperaturas mais baixas (8 °C e 10 °C), resultando nos maiores valores de RMSE (Tabela 5.3). Esse resultado sugere que o crescimento dessa bactéria foi superestimado a essas temperaturas, como pode ser observado na Figura 5.5. Mesmo havendo

essa diferença, considera-se que o modelo prevê bem o crescimento, por estar falhando pelo lado seguro (concentração superestimada).

5.3.2 Modelagem da interação do crescimento de *L. mesenteroides*, *W. viridescens* e *S. enterica* em cocultivo por PMA-qPCR (Abordagem considerando 3 microrganismos)

A resolução do sistema de equações diferenciais (Equações 5.3, 5.4 e 5.5) foi capaz de estimar os seis fatores de competição interespecíficos β_{ij} entre as três bactérias, descritos na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Fatores de competição interespecíficos β_{ij} entre *L. mesenteroides* (LM), *W. viridescens* (WV) e *S. enterica* (SM) em co-cultivo

Fator	Temperatura				
	8° C	10° C	12° C	16° C	20° C
$\beta_{WV/LM}$	-0,37404	-0,13233	-0,76454	0,93504	1,2239
$\beta_{WV/SM}$	1,45893	1,40069	1,79338	-1,23672	-1,20155
$\beta_{LM/WV}$	-1,24754	-1,16009	-0,87614	1,0287	0,95013
$\beta_{LM/SM}$	2,54762	2,5323	1,50384	-1,31279	-0,83108
$\beta_{SM/WV}$	2,19139	2,23565	-12,9744	26,64454	6,16584
$\beta_{SM/LM}$	-1,48021	-1,26708	11,45943	-20,7643	-4,3202

Valores de $\beta < 1$ indicam que a competição que prevalece na co-cultura foi intraespecífica (Blanco-Lizarazo; Sotelo-Díaz; Llorente-Bousquets, 2016). De acordo com Dens, Vereecken e Van Impe (1999), para um estado de não coexistência entre duas espécies, ou seja, com uma espécie interferindo no crescimento da outra, os valores de $N_1^{\max} - \beta_{12}N_2^{\max}$ e $N_2^{\max} - \beta_{21}N_1^{\max}$ devem ter sinais opostos (Tabela 5.5). Sinais idênticos indicam coexistência entre as bactérias.

Tabela 5.5 Sinais dos valores de $N_1^{\max} - \beta_{12}N_2^{\max}$ e $N_2^{\max} - \beta_{21}N_1^{\max}$

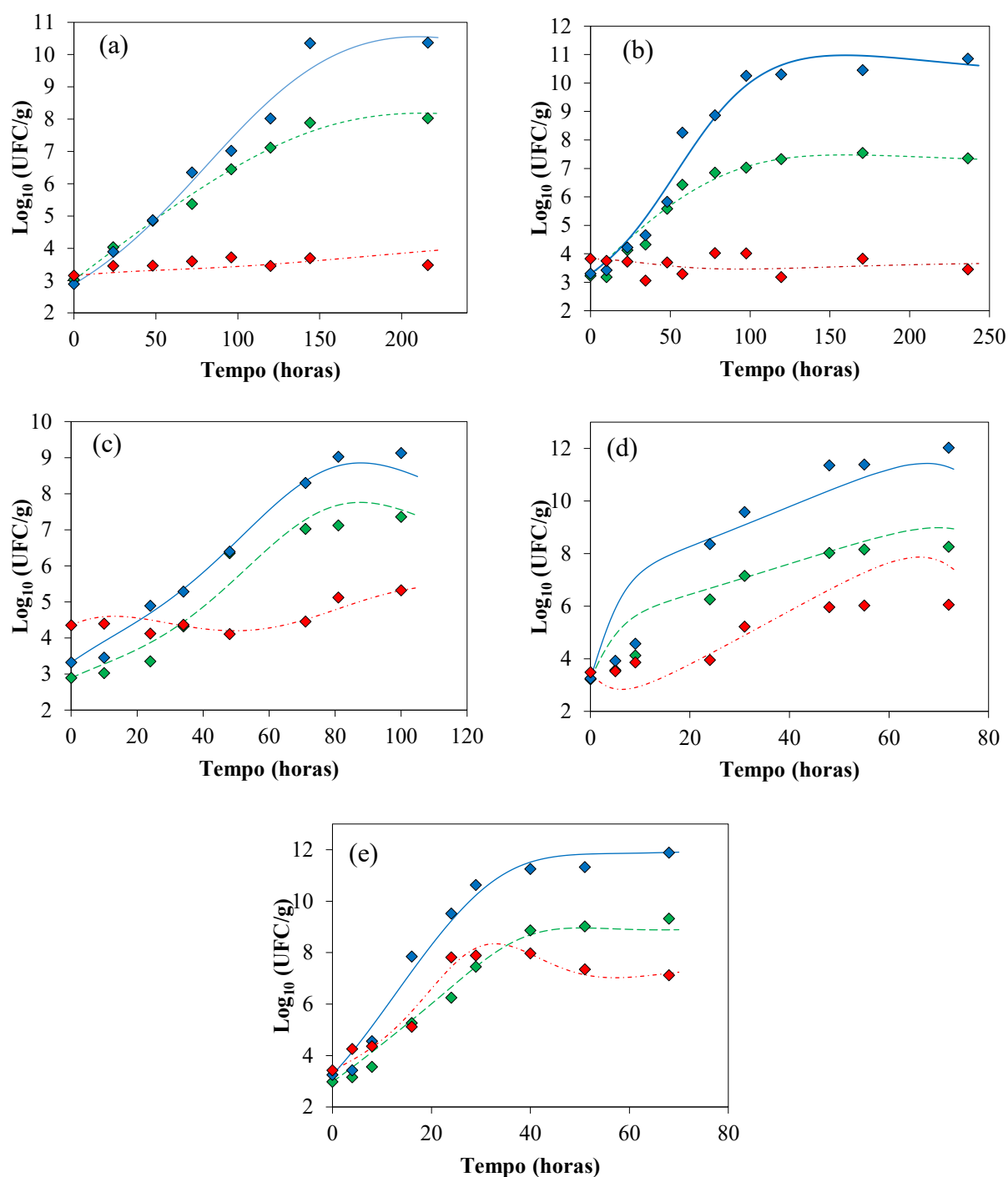
Temperatura	Interação binária		
	WV/SM	LM/SM	WV/LM
8 °C	- / -	- / +	+ / +
10 °C	- / +	- / +	+ / +
12 °C	+ / -	- / -	+ / +
16 °C	- / +	- / +	- / +
20 °C	- / +	+ / +	+ / -

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5.5, é possível observar que não há coexistência de nenhuma das BAL com a *S. enterica* em nenhuma das temperaturas estudadas. Em 10 °C e 16 °C, tanto a *W. viridescens* quanto a *L. mesenteroides* não alcançaram estado de coexistência com a *S. enterica*. Na temperatura de 8 °C a *L. mesenteroides* competiu com a *S. enterica*, enquanto em 12 °C e 20 °C a *W. viridescens* interferiu no crescimento da *S. enterica*. Em relação à interação entre as duas BAL, em temperaturas mais baixas (8 °C a 12 °C) houve estado de coexistência entre as bactérias, algo que não aconteceu em temperaturas de abuso (16 °C e 20 °C). Como pode ser observado também na figura 5.6.

O modelo de interação de três bactérias, baseado no efeito Jameson, descreveu muito bem a avaliação da interação entre as três bactérias estudadas, com valores de RMSE variando de 0,1108 a 0,1948 para *S. enterica*, de 0,0934 a 0,2510 para *W. viridescens*, e de 0,1518 a 0,2823 para *L. mesenteroides*.

No estudo realizado por (Jia *et al.*, (2020), observou-se que a microbiota natural de frango moído inibiu o crescimento do coquetel de *S. enterica* (*S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*) a temperaturas abaixo de 16 °C, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Além disso, Jia *et al.* (2020) também relataram a ausência de crescimento de *S. enterica* em co-cultura com a microbiota natural em frango moído armazenado a 8 °C. Da mesma forma, no presente trabalho, o coquetel de *S. enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Enteritidis*) não apresentou crescimento em co-cultura com as BAL *L. mesenteroides* e *W. viridescens* em presunto de peru armazenado na mesma condição.

Figura 5.6 experimentais observados e simulações obtidas pelo modelo preditivo de interação de três bactérias (Equações 5.3-5.5) para *L. mesenteroides* (♦), *W. viridescens* (◆) e *S. enterica* (◆) em presunto de peru armazenado em condições isotérmicas: (a) 8 °C, (b) 10 °C, (c) 12 °C, (d) 16 °C, (e) 20 °C. Linhas tracejadas vermelha representam as simulações para as cepas de *S. enterica*, linhas tracejadas verdes representam as simulações para as cepas de *W. viridescens* e linhas sólidas azuis representam as simulações para *L. mesenteroides*.



5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Em conclusão da abordagem de avaliação de dois tipos de bactérias, a inibição de *S. enterica* por *L. mesenteroides* em presunto de peru fatiado e embalado a vácuo variou conforme a temperatura. Em condições de refrigeração (8 °C e 10 °C), *S. enterica* não apresentou crescimento, enquanto a 12 °C, 16 °C e 20 °C, seu crescimento foi interrompido ou significativamente reduzido quando *L. mesenteroides* atingiu sua população máxima. Esse fenômeno foi muito bem descrito pelo modelo modificado do efeito Jameson.

Na abordagem de avaliação considerando três tipos de bactérias, os resultados destacaram a importância das BAL na inibição da bactéria patogênica *S. enterica* em presunto de peru, contribuindo para a segurança dos alimentos. O modelo de interação de três espécies baseado no efeito Jameson demonstrou eficácia na avaliação da interação entre as três bactérias estudadas, com valores de RMSE variando de 0,1108 a 0,1948 para *S. enterica*, de 0,0934 a 0,2510 para *W. viridescens*, e de 0,1518 a 0,2823 para *L. mesenteroides*. Além disso, o método PMA-qPCR foi capaz de diferenciar o crescimento das BAL em co-cultivo aumentando a robustez do modelo de interação. Assim, acredita-se que os modelos de interação desenvolvidos para produtos cárneos prontos para consumo serão valiosos para futuras avaliações de exposição e risco, permitindo prever as concentrações de *S. enterica* e contribuindo para a avaliação do risco de infecções por esse patógeno.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO GERAL

6. CONCLUSÃO GERAL

Esta tese investigou o crescimento de bactérias ácido-láticas (BAL) deteriorantes e do patógeno *Salmonella enterica*, além de suas interações em presunto de peru fatiado e embalado a vácuo sob diferentes temperaturas de armazenamento, utilizando métodos convencionais e moleculares, combinados com a microbiologia preditiva. A partir dos resultados discutidos e das conclusões apresentadas no final de cada seção, podem ser destacadas as seguintes conclusões:

- A comparação entre os métodos PMA-qPCR e contagem em placa (CP), ambos associados à modelagem preditiva, demonstrou boa correlação e concordância na quantificação das curvas de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella viridescens*. No entanto, o método CP subestimou o crescimento de *W. viridescens* a 8 °C, sugerindo estresse bacteriano em baixas temperaturas. Os modelos de Baranyi e Roberts, bem como os modelos exponencial secundário e de raiz quadrada, descreveram adequadamente essas curvas. Concluiu-se que o PMA-qPCR é uma alternativa mais precisa para descrever o crescimento de BAL em produtos cárneos prontos para consumo sob refrigeração;
- A integração do método PMA-qPCR com modelagem preditiva para quantificar o crescimento de três sorotipos de *S. enterica* em diferentes temperaturas isotérmicas demonstrou ser uma abordagem eficaz para a segurança de alimentos. O PMA-qPCR mostrou alta sensibilidade e foi capaz de diferenciar células viáveis de não viáveis, ao contrário do método convencional de CP. Os modelos desenvolvidos permitiram prever com precisão as temperaturas mínimas de crescimento de *S. enterica*, essencial para aumentar a segurança de produtos cárneos refrigerados.
- A inibição de *S. enterica* por *L. mesenteroides* variou conforme a temperatura. Em condições de refrigeração (8 °C e 10 °C), *S. enterica* não apresentou crescimento, enquanto a 12 °C, 16 °C e 20 °C, seu crescimento foi interrompido ou significativamente reduzido. O modelo modificado do efeito Jameson descreveu bem esse fenômeno. Na interação entre três espécies (*S. enterica*, *L. mesenteroides* e *W. viridescens*), a importância das BAL na inibição de *S. enterica* foi destacada, com modelo de interação de três bactérias demonstrando eficácia na avaliação das interações bacterianas. O método PMA-qPCR aumentou a robustez do modelo de interação, destacando seu valor na avaliação de risco.

Esta tese de doutorado contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre a aplicação de métodos moleculares e modelos preditivos na avaliação do crescimento e interação de microrganismos em produtos cárneos prontos para consumo. Os resultados obtidos têm implicações importantes para a indústria de carne, autoridades de saúde pública e pesquisadores, auxiliando na produção de alimentos mais seguros e de maior qualidade.

REFERÊNCIAS

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA, 2024. Relatório Anual de Aves. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual-2024_capa_f.pdf. Acesso em: 6 abr. 2024.

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. Saisines no. 2006-SA-0215 et no. 2007-SA-0174. Maison-Alfort, France: AFSSA, 2008.

AKBAR, A.; ANAL, A. K. Isolation of Salmonella from ready-to-eat poultry meat and evaluation of its survival at low temperature, microwaving and simulated gastric fluids. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 3051–3057, 2015.

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**, [s. l.], v. 240, n. 4, p. 4, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051630304X>.

ALIÑO, M. *et al.* Development of a low-sodium ready-to-eat desalted cod. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 107, n. 3–4, p. 304–310, 2011.

ALLENDE, A.; BOVER-CID, S.; FERNÁNDEZ, P. S. **Challenges and opportunities related to the use of innovative modelling approaches and tools for microbiological food safety management**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.

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**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 123–144, 2005.

ANDINO, A.; HANNING, I. Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. **Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2015, 2015.

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

AXELSSON, P.; NYSTROM, B.; LINDHE, J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. **Journal of Clin Periodontol**, [s. l.], v. 31, p. 749–757, 2004.

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

BARANYI, József; ROBERTS, T. A. **Review Paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food** *International Journal of Food Microbiology*. [S. l.: s. n.], 1994.

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

BARCENILLA, C. *et al.* Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. **Meat Science**, [s. l.], v. 183, 2022.

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**, [s. l.], v. 213, n. 6, p. 432–438, 2001.

BESSER, J. M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 71, p. 55–59, 2018.

BETERAMS, A. *et al.* Change of *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* counts in packaged broiler breast meat stored under modified atmosphere and vacuum conditions at 4 and 10 °C based on cultural and molecular biological quantification. **Food Control**, [s. l.], v. 145, 2023.

BIRK, T. *et al.* Chicken juice, a food-based model system suitable to study survival of *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 66–71, 2004.

BLANCO-LIZARAZO, C. M.; SOTELO-DÍAZ, I.; LLORENTE-BOUSQUETS, A. In vitro modelling of simultaneous interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus*. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 341–348, 2016.

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

BLAND, J. Martin.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **The Lancet**, [s. l.], p. 307–310, 1986.

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

BOUJU-ALBERT, A.; PILET, M. F.; GUILLOU, S. Influence of lactate and acetate removal on the microbiota of French fresh pork sausages. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 76, p. 328–336, 2018.

BRANDS, D. A. *et al.* Prevalence of *Salmonella* spp. in oysters in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 893–897, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC, nº 724, de 01 de julho de 2022. Instrução normativa - IN nº 161, de 01 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos, 2022. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Acesso em: 27 abr. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe – 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024>. Acesso em: 27 abr. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 74, de 7 de maio de 2019. Disponível em: <https://idaf.es.gov.br/Media/idaf/Documentos/Legisla%C3%A7%C3%A3o/SIE/PORTARIA%2074,%20DE%207%20DE%20MAIO%20DE%202019.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC, nº 724, de 01 de julho de 2022. Instrução normativa - IN nº 161, de 01 de julho de 2022. **Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos, 2022.** https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Acesso em: 27 de abr. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe – 2024.** Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024>. Acesso em: 27 de abr. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria nº 74, de 7 de maio de 2019**. Disponível em: <https://idaf.es.gov.br/Media/idaf/Documentos/Legisla%C3%A7%C3%A3o/SIE/PORTARIA%2074,%20DE%207%20DE%20MAIO%20DE%202019.pdf>.

BUCHANAN, R. L. Predictive food microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 6–11, 1993.

BUNCE, C. **Correlation, Agreement, and Bland-Altman Analysis: Statistical Analysis of Method Comparison Studies**. [S. l.: s. n.], 2009.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 23–39, 2002.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAO, Y. *et al.* Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 3, 2020.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.

CAVADA, C. A.; CARDOSO, F. M. Comparação de três metodologias para quantificação de *Salmonella* sp . em efluentes de sistemas de tratamento de dejetos. [s. l.], v. 38, n. 9090, p. 17–23, 2010.

CAVALCANTI, É. N. F. *et al.* Breast meat quality of turkey breeder hens at disposal age affected by deep pectoral myopathy. **Poultry Science**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 1–7, 2021.

CHA, H. *et al.* Effect of modified atmosphere packaging on the quality characteristics and bacterial community succession of super-chilled chicken meat in biopreservation. **LWT**, [s. l.], v. 189, 2023.

CHOI, W. S. *et al.* Predictive model of *Staphylococcus aureus* growth on egg products. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 913–922, 2019.

CLAIS, S. *et al.* Comparison of viable plate count, turbidity measurement and real-time PCR for quantification of *Porphyromonas gingivalis*. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 79–84, 2015.

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**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 595–603, 1993.

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

COMI, G.; IACUMIN, L. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile off-flavour compounds in artisan cooked ham. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 114–121, 2012.

CORNÚ, M.; BILLOIR, E.; BERGIS, H.; BEAUFORT, A.; ZULIANI, V. Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 639–647, 2011. DOI: 10.1016/j.fm.2010.08.007.

COSTA, J. C. C. P. *et al.* Modelling the interaction of the sakacin-producing *Lactobacillus sakei* CTC494 and *Listeria monocytogenes* in filleted gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under modified atmosphere packaging at isothermal and non-isothermal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 297, p. 72–84, 2019.

COTON, M. *et al.* Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 85, p. 21–26, 2018.

CUNNINGHAM, E.; O'BYRNE, C.; OLIVER, J. D. Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. **Food Control**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1141–1144, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.005>.

DA COSTA, F. K. C. *et al.* Modeling the influence of propionic acid concentration and pH on the kinetics of *Salmonella Typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 416, 2024.

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

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.

DAS DORES, Milene Therezinha; FERREIRA, Célia Lucia de Lucas Fortes. Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 2012

DEEPAK *et al.* Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. **Current Genomics**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 234–251, 2007. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=8&issue=4&spage=234>.

DENS, E. J.; VEREECKEN, K. M.; VAN IMPE, J. F. A Prototype Model Structure for Mixed Microbial Populations in Homogeneous Food Products. **Journal of Theoretical Biology**, [s. l.], v. 201, n. 2, p. 159–170, 1999.

DEVOYOD, J. J.; POULLAIN, F. Propriétés : Les *Leuconostocs*. **Le Lait**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 249–280, 1988.

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**, [s. l.], v. 131, n. 2–3, p. 168–177, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.019>.

DOMINGUEZ, S. A.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the Growth of *Salmonella* in Raw Poultry Stored under Aerobic Conditions. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 12, p. 2429–2435, 2008.

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

DOW, A.; ALVARADO, C.; BRASHEARS, M. Reduction of inoculated *Salmonella* cocktail in ground turkey and turkey breasts using *Lactobacillus*-based intervention. **Poultry Science**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 876–879, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2010-00807>.

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

DUŠKOVÁ, M.; KAMENÍK, J.; KARPÍŠKOVÁ, R. ***Weissella viridescens* in meat products - A review**. [S. l.: s. n.], 2013.

EC. Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L338, p. 1-26, Brussels, Belgium, 2005.

EHUWA, O.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Salmonella, food safety and food handling practices. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2021.

ELIZAQUIVEL, 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**, [s. l.], v. 278, n. 1, p. 62–71, 2008.

ELMAS, F. *et al.* The effect of pre-drying methods on physicochemical, textural and sensory characteristics on puff dried Turkey breast meat. **LWT**, [s. l.], v. 145, 2021.

EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.; CONNERTON, I. Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 131, n. 2–3, p. 197–202, 2009.

FERNANDO, D. *et al.* Analysing the lag – growth rate relationship of *Yersinia enterocolitica*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 01, p. 197–201, 2002.

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

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 276–289, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.007>.

FLINT, S. **Molecular Methods for Microbial Analysis in the Food Industry**. [S. l.]: Elsevier, 2016. v. 54 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03397-7>.

FOLEY, S. L. *et al.* Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 13, p. 4273–4279, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2023.

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

GAMIL, B. *et al.* The microbiological quality, shelf-life, and multidrug-resistant Salmonella contamination rates assessment in chicken giblets purchased from live poultry shops. **The Microbe**, [s. l.], v. 3, p. 100057, 2024.

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

GARRIDO, V.; GARCÍA-JALÓN, I.; VITAS, A. I. Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. **Food Control**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 896–901, 2010.

GIANNUZZI, L.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 1–2, p. 101–110, 1998.

GIERALTOWSKI, L. *et al.* National outbreak of multidrug resistant Salmonella Heidelberg infections linked to a single poultry company. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1–13, 2016.

GLYNN, B. *et al.* Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 126–139, 2006.

GÓMEZ-ROJO, E. M. *et al.* International Journal of Food Microbiology A novel real-time PCR assay for the specific identification and quantification of *Weissella viridescens* in blood sausages. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 215, p. 16–24, 2015. Disponível em: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.

GU, Y. *et al.* Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1700–1706, 2012.

GUAN, Zhengping *et al.* Analysis of a molecular predictive mode for the growth of *Staphylococcus aureus* in pork. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 68–82, 2017.

GUILLIER, L. Predictive Microbiology Models and Operational Readiness. **Procedia Food Science**, [s. l.], v. 7, n. 0, p. 133–136, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X16300037>.

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

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

HEATH, J. L. *et al.* Effects of high-energy electron irradiation of chicken meat on Salmonella and aerobic plate count. **Poultry science**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 150–156, 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0690150>.

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

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

HEYMANS, R. *et al.* Rapid detection and differentiation of Salmonella species, Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by multiplex quantitative PCR. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1–15, 2018.

HIGUCHI, R. *et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, [s. l.], 1993.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J. da; REIS, E. M. F. dos. Prevalência de sorovares de Salmonella isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 55–62, 1997.

HUANG, C. *et al.* Development of a rapid Salmonella detection method via phage-conjugated magnetic bead separation coupled with real-time PCR quantification. **Lwt**, [s. l.], v. 142, n. January, p. 111075, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111075>.

HUANG, L. International Journal of Food Microbiology IPMP 2013 — A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology ☆. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 171, p. 100–107, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.019>.

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

HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering: Food science: ingredients, health, and safety**. [S. l.]: CRC Press, 2006. v. 2

IACUMIN, L. *et al.* A case of spoilage in wurstel sold in an Italian supermarket. **Food Control**, [s. l.], v. 43, p. 245–250, 2014.

IQBAL, A. *et al.* Classification of pre-sliced pork and Turkey ham qualities based on image colour and textural features and their relationships with consumer responses. **Meat Science**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 455–465, 2010.

JAJERE, S. M. **A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance.** [S. l.]: Veterinary World, 2019.

JAMESON, J. E. A discussion of the dynamics of salmonella enrichment. **Journal of Hygiene**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 193–207, 1962.

JAY, M.; LOESSNER, J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology.** 7 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2005.

Jl, J. *et al.* **Essential oils as natural antimicrobials applied in meat and meat products—a review.** [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2023.

JIA, Z. *et al.* One-step kinetic analysis of competitive growth of Salmonella spp. and background flora in ground chicken. **Food Control**, [s. l.], v. 117, 2020.

JOHN BUTLER. **Forensic DNA Typing.** 2nd Editioed. [S. l.: s. n.], 2005.

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

JUNG, J.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the survival of Salmonella on whole cucumbers as a function of temperature and relative humidity. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 100, n. May, p. 103840, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103840>.

KATIYO, W. *et al.* Sensory implications of chicken meat spoilage in relation to microbial and physicochemical characteristics during refrigerated storage. **Lwt**, [s. l.], v. 128, n. December 2019, p. 109468, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109468>.

KAVITAKE, D.; DEVI, P. B.; SHETTY, P. H. Overview of exopolysaccharides produced by Weissella genus – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 2964–2973, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.185>.

KAWASAKI, S. *et al.* Characterization and Modeling of Salmonella Growth in Pasteurized and Non-pasteurized Milk Using Real-Time PCR. **Japanese Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 28–35, 2014.

KEHL, A.; NOSTER, J.; HENSEL, M. Eat in or Take out? Metabolism of Intracellular Salmonella enterica. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 644–654, 2020.

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**, [s. l.], v. 65, p. 7–18, 2017.

KIPPER, D. *et al.* Genomic characterization of *Salmonella* Minnesota clonal lineages associated with poultry production in Brazil. **Animals**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1–13, 2020.

KIPPER, D. *et al.* Recent Evolution and Genomic Profile of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Poultry Flocks in Brazil. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM>.

KIPROTICH, S. *et al.* Application of Encapsulated and Dry-plated Food Acidulants to Control *Salmonella enterica* in Raw Meat-based Diets for Dogs. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 86, n. 5, 2023.

KOTHARI, D.; TINGIRIKARI, J. M. R.; GOYAL, A. In vitro analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 55–61, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.08.001>.

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**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 124–134, 2006.

KRALIK, P.; RICCHI, M. **A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything**. [S. l.]: Frontiers Research Foundation, 2017.

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

LAZOU, T. P. *et al.* Method-Dependent Implications in Foodborne Pathogen Quantification: The Case of *Campylobacter coli* Survival on Meat as Comparatively Assessed by Colony Count and Viability PCR. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

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**, [s. l.], v. 78, n. 4, 2013.

LI, L. *et al.* Dynamic predictive model for growth of *Salmonella* spp. in scrambled egg mix. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 64, p. 39–46, 2017.

LI, Yang *et al.* Extraction and biological activity of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* SN-8. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 157, p. 36–44, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.150>.

LI, Ying *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in the commercial eggs in China. China: **International Journal of Food Microbiology**, 2020.

LIANG, N. *et al.* Detection of Viable *Salmonella* in Lettuce by Propidium Monoazide Real-Time PCR. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 76, n. 4, 2011.

LIAO, C. *et al.* Simultaneous construction of PCR-DGGE-based predictive models of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* on cooked shrimps. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 210–216, 2015.

LIU, Y.; MUSTAPHA, A. Detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 170, p. 48–54, 2014.

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**, [s. l.], v. 335, p. 88–96, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.06.030>.

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

LONGHI, D. A. *et al.* Optimal experimental design for improving the estimation of growth parameters of *Lactobacillus viridescens* from data under non-isothermal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 240, p. 57–62, 2017.

LUCHANSKY, J. B. *et al.* Viability of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on Slices of a German-Style Bologna Containing Blends of Organic Acid Salts During Storage at 4 or 12°C. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 26, n. 1, 2023.

MAHGOUB, S. A. *et al.* Impact of packaging atmosphere, oregano essential oil, and storage temperature on cold-adapted *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium on ready-to-eat smoked turkey. **Poultry Science**, [s. l.], p. 103846, 2024.

MANDILARA, G. *et al.* The rising burden of salmonellosis caused by monophasic *salmonella* typhimurium (1,4,[5],12:I:-) in greece and new food vehicles. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 1–9, 2021.

MANJANKATTIL, S. *et al.* Effect of pimenta essential oil against *Salmonella* Agona and *Salmonella* Saintpaul in ground turkey meat and nonprocessed turkey breast meat. **Poultry Science**, [s. l.], v. 103, n. 2, 2024.

MARMION, M. *et al.* **The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge**. [S. l.]: Academic Press, 2021.

MARTIN, B. *et al.* Effect of Amplicon Length in Propidium Monoazide Quantitative PCR for the Enumeration of Viable Cells of Salmonella in Cooked Ham. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 683–690, 2013.

MARTÍN, B. *et al.* Rapid quantitative detection of Lactobacillus sakei in meat and fermented sausages by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 6040–6048, 2006.

MARTINS, W. F. *et al.* A mathematical modeling approach to the quantification of lactic acid bacteria in vacuum-packaged samples of cooked meat: Combining the TaqMan-based quantitative PCR method with the plate-count method. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 318, n. October 2018, p. 108466, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108466>.

MARTINS, W. F. *et al.* Comparison of SYBR® Green qPCR assay and plate count method to describe growth of Weissella viridescens and Leuconostoc mesenteroides in pure and mixed cultivation. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 119, 2024.

MARTINS, W. F. *et al.* Growth modelling of Weissella Viridescens by real-time quantitative PCR (qPCR). In: PREDICTIVE MODELLING IN FOOD. 1st. ed. Newcastle upon Tyne: Cambridge Scholars Publishing, 2019. p. 8–9.

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

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

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

MELRO, E. *et al.* Morphological, textural and physico-chemical characterization of processed meat products during their shelf life. **Food Structure**, [s. l.], v. 26, 2020.

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**, [s. l.], v. 139, n. June 2017, p. 113–119, 2018a. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174017308677>.

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**, [s. l.], v. 139, n. June 2017, p. 113–119, 2018b.

MENGISTU, D. A. *et al.* Bacteriological Quality and Public Health Risk of Ready-to-Eat Foods in Developing Countries: Systematic Review and Meta Analysis. **Microbiology Insights**, [s. l.], v. 15, p. 117863612211139, 2022.

MESSENS, W.; HEMPEN, M.; KOUTSOUMANIS, K. **Use of predictive modelling in recent work of the Panel on Biological Hazards of the European Food Safety Authority**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.

MILANI, G. *et al.* Technological traits and mitigation activity of autochthonous lactic acid bacteria from mediterranean fermented meat-products. **LWT**, [s. l.], v. 196, 2024.

MILKIEVICZ, T. *et al.* Development of a general model to describe *Salmonella* spp. growth in chicken meat subjected to different temperature profiles. **Food Control**, [s. l.], v. 112, n. January, p. 107151, 2020.

MIOTTO, M. *et al.* Optimization of a propidium monoazide-qPCR method for *Escherichia coli* quantification in raw seafood. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 318, 2020.

MOHAMMAD, Z. H. *et al.* Effect of air- and vacuum-packaged atmospheres on the reduction of *Salmonella* on almonds by electron beam irradiation. **Lwt**, [s. l.], v. 116, n. April, p. 108389, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108389>.

MONGE BRENES, A. L. *et al.* Temperature profiling of open- and closed-doored produce cases in retail grocery stores. **Food Control**, [s. l.], v. 113, 2020.

MØLLER, C. O. A. *et al.* Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella* spp. in fresh pork - A predictive microbiology approach. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 284–295, 2013.

MONAHAN, L. G.; HARRY, E. J. **You Are What You Eat: Metabolic Control of Bacterial Division**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2016.

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

MONTE, D. F. *et al.* Current insights on high priority antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in food and foodstuffs: a review. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 26, p. 35–46, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.004>.

MUNDT, J. O. Lactic Acid Bacteria Associated With Raw Plant Food Material1. **Journal of Milk and Food Technology**, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 550–553, 1970.

MURASE, T. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of salmonella enterica subsp. Enterica serovar typhimurium monophasic variants isolated in Thailand and Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, [s. l.], v. 80, n. 12, p. 1839–1846, 2018.

NDRAHA, N. *et al.* Time-temperature abuse in the food cold chain: Review of issues, challenges, and recommendations. **Food Control**, [s. l.], v. 89, p. 12–21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.027>.

NIEMINEN, T. T. *et al.* Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 144, n. 3, p. 360–366, 2011.

NOCKER, A.; CHEUNG, C. Y.; CAMPER, A. K. 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**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 310–320, 2006.

NOVIYANTI, F. *et al.* **A comparison of Listeria monocytogenes growth monitoring in ground pork samples by real-time polymerase chain reaction to conventional agar and most probable number methods.** [S. l.]: Japanese Society for Food Science and Technology, 2021.

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**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 406–412, 2018.

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

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

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

OLIVER, J. D. **Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria.** [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2010.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Review Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 2, n. 2, 2005. Disponível em: www.liebertpub.com.

OSCAR, T. P. Predictive model for survival and growth of *Salmonella* Typhimurium DT104 on chicken skin during temperature abuse. **Journal of Food Protection**, Princess Anne, v. 72, n. 2, p. 304-314, 2009.

PACHOLEWICZ, E. *et al.* Internal sample process control improves cultivation-independent quantification of thermotolerant *Campylobacter*. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 78, p. 53–61, 2019.

PAGANINI, C. C. *et al.* Modelling the inactivation, survival and growth of *Salmonella enterica* under osmotic stress considering inoculum phase and serotype. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 132, n. 5, p. 3973–3986, 2022.

PAL, A.; LABUZA, T. P.; DIEZ-GONZALEZ, F. Shelf life evaluation for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 126, n. 1–2, p. 49–56, 2008.

PAPIC, L. *et al.* Significant Factors of the Successful Lean Six-Sigma Implementation. **Jpn. J. Food Microbiol.**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 28–35, 2014. Disponível em: <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/108056>. Acesso em: 28 maio 2024.

PAPUC, C. *et al.* Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1243–1268, 2017.

PARRY-HANSON KUNADU, A.; OTWEY, R. Y.; MOSI, L. Microbiological quality and *Salmonella* prevalence, serovar distribution and antimicrobial resistance associated with informal raw chicken processing in Accra, Ghana. **Food Control**, [s. l.], v. 118, n. April, p. 107440, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107440>.

PASSING, H.; BABLOK, W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 709–720, 1983. Disponível em: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.1983.21.issue-11/cclm.1983.21.11.709/cclm.1983.21.11.709.xml>.

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**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 266–273, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.007>.

PEDROLO, A. M. *et al.* Enumeration of plant growth-promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* viable cells by a propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR) assay. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 197, 2024.

PERRY, L. *et al.* Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **Juornal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, [s. l.], v. 15, p. 176–198, 2007.

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

PODOLAK, I.; GALANTY, A.; SOBOLEWSKA, D. **Saponins as cytotoxic agents: A review**. [S. l.: s. n.], 2010.

PORTER, J. A.; MOREY, A.; MONU, E. A. Antimicrobial efficacy of white mustard essential oil and carvacrol against *Salmonella* in refrigerated ground chicken. **Poultry Science**, [s. l.], v. 99, n. 10, p. 5091–5095, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.027>.

POSSAS, A. *et al.* Application of predictive models to assess the influence of thyme essential oil on *Salmonella* Enteritidis behaviour during shelf life of ready-to-eat turkey products. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 240, p. 40–46, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.003>.

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

POWELL, M.; SCHLOSSER, W.; EBEL, E. Considering the complexity of microbial community dynamics in food safety risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 90, p. 171–179, 2004.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. **Food safety - Salmonella update in broilers**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019.

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**, [s. l.], v. 63, n. May 2016, p. 34–45, 2016.

RAMAMURTHY, T. *et al.* **Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria**. [S. l.]: Frontiers Media S. A, 2014.

RATKOWSKY, D. A. *et al.* Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature Model for Bacterial Culture Growth Rate Throughout the Entire Biokinetic Temperature Range. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 154, n. 3, p. 1222–1226, 1982.

RAU, R. B. *et al.* Antimicrobial resistance of Salmonella from poultry meat in Brazil: results of a nationwide survey. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 149, p. 26–39, 2021.

RIZZOTTI, L. *et al.* Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. **Food Control**, [s. l.], v. 47, p. 407–412, 2015.

RODGERS, J. D. *et al.* Sensitivity of Direct Culture, Enrichment and PCR for Detection of Campylobacter jejuni and C. coli in Broiler Flocks at Slaughter. **Zoonoses and Public Health**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 262–271, 2017.

RODRIGUEZ DE MASSAGUER, P. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2006.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. R. *et al.* Sensory and microbiological quality evaluation of vacuum-packed sliced cooked chicken breast. Shelf-life estimation. **Journal of Food Quality**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 105–122, 2003.

ROLFE, M. D. *et al.* Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 194, n. 3, p. 686–701, 2012.

ROSS, T. **Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology** *Journal of Applied Bacteriology*. [S. l.: s. n.], 1996.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A.; BARANYI, J. Predictive microbiology and food safety. **Encyclopedia of Food Microbiology, volume 3**, [s. l.], v. 3, p. 1699–1710, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00256-1>.

SAENZ-GARCÍA, C. E. *et al.* Insights into the identification of the specific spoilage organisms in chicken meat. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 2, 2020.

SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, [s. l.], 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 a** *International Journal of Food Microbiology*. [S. l.: s. n.], 2000b. Disponível em: www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro. .

SANTOS, E. M. *et al.* Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 285–296, 2005.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H.; BJORKROTH, K. J. Food spoilage microorganisms. *In*: BLACKBURN, C. W. (org.). **Lactic acid bacteria**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2006. p. 541–578.

SERRA-CASTELLÓ, C. *et al.* A mathematical model to predict the antilisteria bioprotective effect of *Lactobacillus sakei* CTC494 in vacuum packaged cooked ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 363, p. 109491, 2022. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109491.

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.

SHER, A. A. *et al.* Outbreaks of foodborne *Salmonella enteritidis* in the United States between 1990 and 2015: An analysis of epidemiological and spatial-temporal trends. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 105, p. 54–61, 2021.

SILVA, D. C. da *et al.* Mathematical modelling and validation of *Salmonella enterica* growth in sushi exposed to different time-temperature scenarios found in real sushi establishments. **Food Research International**, [s. l.], v. 136, n. July, p. 109609, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109609>.

SILVA, A. P. R. da *et al.* Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 61, 2018.

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

SLONGO, A. P. *et al.* Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 303–306, 2009.

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

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

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. **Food Research International**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 455–481, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>.

STRATAKOS, A. C. *et al.* Effect of high pressure processing in combination with *Weissella viridescens* as a protective culture against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads of different pH. **Food Control**, [s. l.], v. 61, p. 6–12, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.020>.

STREMEL, D. P. *et al.* Avaliação De Diferentes Rotas De Produção De Etanol Biocombustível a Partir De Resíduos De Indústrias Lácteas¹. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, [s. l.], v. 2, p. 1–10, 2013.

SU, C. P.; JANE, W. N.; WONG, H. chung. Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 360–366, 2013.

SUN, Y. *et al.* Stress response of *Salmonella* Newport with various sequence types toward plasma-activated water: Viable but nonculturable state formation and outer membrane vesicle production. **Current Research in Food Science**, [s. l.], v. 8, 2024.

SUN, X. D.; HOLLEY, R. A. Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 340–354, 2012.

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

TARLAK, F. **The Use of Predictive Microbiology for the Prediction of the Shelf Life of Food Products**. [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2023.

TELLI, A. E.; DOĞRUER, Y. Discrimination of viable and dead *Vibrio parahaemolyticus* subjected to low temperatures using Propidium Monoazide – Quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 132, n. April, p. 109–116, 2019.

TIRLONI, E. *et al.* A new predictive model for the description of the growth of *Salmonella* spp. in Italian fresh ricotta cheese. **LWT**, [s. l.], v. 143, n. November 2020, p. 111163, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111163>.

TORRES-BAIX, E. *et al.* Computed tomography and predictive microbiology for non-invasive evaluation of the impact of dry-cured ham production process conditions on the behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Clostridium botulinum*. **Meat Science**, [s. l.], v. 202, 2023.

TSAFRAKIDOU, P. *et al.* Assessment of the spoilage microbiota in minced free-range chicken meat during storage at 4 °C in retail modified atmosphere packages. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 99, n. April, p. 103822, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103822>.

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

VAN MASTRIGT, O. *et al.* Aroma formation in retentostat co-cultures of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 82, n. July 2018, p. 151–159, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.016>.

VELD, H. in't. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 33, p. 1–18, 1996.

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

VOSS-RECH, D. *et al.* Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 233, p. 118–123, 2019.

WANG, Y. *et al.* Detection of viable *Salmonella* in ice cream by TaqMan real-time polymerase chain reaction assay combining propidium monoazide. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 480–485, 2015.

WERLANG, G. O. *et al.* Application of a predictive microbiological model for estimation of *Salmonella* behavior throughout the manufacturing process of salami in environmental conditions of small-scale Brazilian manufacturers. **Microbial Risk Analysis**, [s. l.], v. 19, 2021.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. **A classification of models in predictive microbiology - a reply to K.R. Davey** **Food Microbiology**, 1993.

WULSTEN, I. F.; GALEEV, A.; STINGL, K. Underestimated Survival of *Campylobacter* in Raw Milk Highlighted by Viability Real-Time PCR and Growth Recovery. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

XIAN, Z. *et al.* Comparison between qPCR, VIDAS immunoassays, and agar streaking for the detection of *Listeria monocytogenes* from food and environmental surfaces containing and not containing *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 86, n. 5, 2023.

XIAO, L. *et al.* Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment. **Food Control**, [s. l.], v. 57, p. 185–189, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.050>.

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**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 246–254, 2013.

YUTING, S. *et al.* **Shang Et Al, Scutellaria.Pdf**. China: LWT - Food Science and Technology, 2021.

ZHANG, Q. Q. *et al.* The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. **Poultry Science**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 208–214, 2012.

ZHAO, F. *et al.* Effects of Different Storage Temperatures on Bacterial Communities and Functional Potential in Pork Meat. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 15, 2022.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZHOU, S. *et al.* Prediction of *Salmonella* inactivation in sliced tomato subject to high pressure processing and trans-cinnamaldehyde treatment using selective and non-selective growth media for survival evaluations. **Food Control**, [s. l.], v. 118, n. June, p. 107441, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107441>.

**APÊNDICE A – RESUMO E CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO
PUBLICADO NO 14 SLACA - SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE
ALIMENTOS, EM 2021**



COMPARISON OF A QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY WITH A PLATE COUNT METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF INOCULATED *SALMONELLA* COCKTAIL IN TURKEY BREASTS

SEVERO¹, D.S.; MARTINS², W.F.; LONGHI³, D.A.; ARAGÃO⁴, G.M.F.

¹Federal University of Santa Catarina – Santa Catarina, dann_i_severo@hotmail.com

²Federal Institute of Education, Science and Technology Goiano – Goiás, wiaslan.martins@ifgoiano.edu.br

³Federal University of Paraná – Paraná, ealdaniel@ufpr.br

⁴Federal University of Santa Catarina – Santa Catarina, glaucia.aragao@ufsc.br

Abstract: Salmonellosis is linked to the consumption of *Salmonella*-contaminated food products such as beef, pork, poultry meat, and other foods. The aim of this research was to establish a standard curve for comparing the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method and the plate count method, both used to quantify inoculated *Salmonella* cocktail (Typhimurium ATCC 14028, Enteritidis ATCC 13046, and Heidelberg isolated from a poultry industry) in turkey breasts. The chilled turkey breast slices (14 g) were inoculated with 0,1 mL of *Salmonella* cocktail (10^7 CFU/g), vacuum-packed, and then stored at 16 °C (temperature abuse storage). The initial sample count was 10^3 CFU/g. *Salmonella* growth curves were constructed by plating on Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar and Brain Heart Infusion (BHI) Agar until the stationary growth phase. The *Salmonella* invasion gene (*invA*) copy number was quantified by qPCR and converted to *Salmonella* cell concentration. *Salmonella* counts after 11 hours of the cultivation in XLD medium were not possible, while the *Salmonella* growth was quantified until the stationary growth phase (8.55 log CFU/g) in BHI medium. The standard curve showed a slope of -3.50, an R^2 correlation coefficient of 0.99, and a reaction efficiency of 93%. From the standard curve, the quantification of the *Salmonella* concentration was possible to all growth phases. *Salmonella* growth showed a concentration of 3.84 log CFU/g by qPCR, while it was not visible on XLD plates at 27 hours of cultivation. These results highlight the importance of the quantification of foodborne pathogens by using new rapid methods. Therefore, it is proposed to assist the meat industry in understanding quantitative detection protocols to reduce the pathogen risk with greater precision and to ensure product safety.

Órgãos Financiadores: Foundation for the Support of the Scientific and Technological Research of Santa Catarina State

Palavras-chave: Meat Product; Foodborne; qPCR



APÊNDICE B – RESUMO E CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO PUBLICADO NA CoFE – CONFERENCE OF FOOD ENGINEERING EM 2022

Abstract Template

Title: Font Calibri 12

Modeling the inhibitory effect of lactic acid bacteria on *Salmonella* inoculated into sliced refrigerated turkey breast vacuum packed: comparison of conventional and molecular methods.

Authors & affiliations: Font Calibri 10

Danielle de Sousa Severo¹
Wiaslan Figueiredo Martins²
Jean Carlos Correia Peres Costa³
Marília Miotto⁴
Silvani Verruck⁴
Rafael Rodrigues de Oliveira⁵
Gláucia Maria Falcão de Aragão¹

¹ Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

² Department of Food Technology, Goiano Federal Institute of Education, Science and Technology, IF Goiano/Campus Morrinhos, 75650-000, Morrinhos, GO, Brazil.

³ Department of Bromatology and Food Technology, University of Córdoba, Spain.

⁴ Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, 88034-000, Florianópolis, SC, Brazil.

⁵ Development and Innovation Coordinator, Neoprospecta, 88056-000, Florianópolis, SC, Brazil.

Abstract: 300 words, Font Calibri 12

Some lactic acid bacteria (LAB), as *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella viridescens*, constitute a group responsible for the deterioration of vacuum-packed meat products, as turkey breast, causing greening, production of slime on the surface, formation of undesirable odors and loss of vacuum in the packaging. Other microorganisms that grow in turkey-based meat products are pathogenic bacteria, such as *Salmonella* species, which can survive under refrigeration. Literature presents studies modelling the growth of pathogenic and/or spoilage bacteria applying conventional microbiological methods, such as the standard plate counting method (PCM). This method, however, does not allow the differentiation of morphologically similar strains (mixed culture), such as the different contaminating LAB. Thus, molecular methods, such as q-PCR, have been an alternative for the quantification and differentiation of microorganisms in mixed culture. Given the importance of these bacteria, the aim of this work is study and model the growth of *L. mesenteroides* and *W. viridescens* in mix culture with *Salmonella enterica* sorotypes cocktail in sliced refrigerated turkey breast, using PMA-qPCR. The monoazide propidium (PMA) dye penetrates non-viable bacterial cells and these cells cannot be amplified in the qPCR reaction. The growth curves of pure and mix culture were obtained from inoculated sliced turkey breast vacuum packed comparing conventional PCM and PMA-qPCR, incubated at 8, 10, 12, 16 and 20 °C. The results showed good correlation between conventional and molecular methods with the advantage that PMA-PCRq method differentiates the species of bacteria. In mix culture, the inhibition effect of LAB over *Salmonella* was observed and the model considering Jameson effect fitted well to experimental data. The results are very important because it is possible to know the dominant bacteria and the effect of its growth on an important pathogenic bacterium. This work contributes to the safety and increase of the shelf life of an important meat product.



<https://socfoodeng.org>
 Email: societyoffoodengineering@gmail.com

October 7, 2022

To Whom it May Concern:

This is to certify that Gláucia Maria Falcão de Aragão participated in the Conference of Food Engineering at Raleigh, North Carolina, USA on September 18-21, 2022, at which she presented the following posters.

Poster 228 Title: Flow cytometry method applied to elucidate physiological state of *Salmonella Typhimurium* populations osmotically stressed throughout the Phenomenon Phoenix.

Authors: Camila Casagrande Paganini, Daniel Angelo Longhi, Gláucia Maria Falcão de Aragão, Bruno Augusto Mattar Carciofi.

Poster 229 Abstract Title: Chemical composition and antimicrobial effect modeling of *Croton blanchetianus* Baill essential oil

Abstract Authors: Elayne Cardoso de Vasconcelos, Daniel Angelo Longhi, Camila Casagrande Paganini, Danielle de Souza Severo, Kirley Marques Canuto, Ana Sheila de Queiroz Souza, Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, Gláucia Maria Falcão de Aragão.

Poster 232: Title: Modeling the inhibitory effect of lactic acid bacteria on *Salmonella* inoculated into sliced refrigerated turkey breast vacuum packed: comparison of conventional and molecular methods.

Authors: Danielle de Sousa Severo, Wiaslan Figueiredo Martins, Jean Carlos Correia Peres Costa, Marília Miotto, Silvani Verruck, Rafael Rodrigues de Oliveira, Gláucia Maria Falcão de Aragão.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Sudhir K. Sastry'.

Sudhir K. Sastry
President