

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS**  
**BIOTECNOLÓGICOS**

**AUGUSTUS CAESER FRANKE PORTELLA**

**MODELAGEM DO EFEITO ANTAGÔNICO DE *Lactobacillus* SOBRE**  
***Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus***  
**PELA ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA COM ENFOQUE**  
**BAYESIANO**

**CURITIBA**

**2007**

**AUGUSTUS CAESER FRANKE PORTELLA**

**MODELAGEM DO EFEITO ANTAGÔNICO DE *Lactobacillus* SOBRE  
*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus*  
PELA ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA COM ENFOQUE  
BAYESIANO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, da Universidade Federal do Paraná.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Luiz Parada

**CURITIBA**

**2007**

À José Meirelles Portella (*in  
memorian*), por haver me  
incentivado a não abandonar  
meus ideais.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade e orientação durante a realização do trabalho, apoio e compreensão.
- Ao Prof. Dr. José Luis Parada, pela valorosa transmissão de seus conhecimentos.
- À Prof. Dra. Luciana Vandenberghe pelas oportunas sugestões e ajuda.
- À Doutoranda Flavera Camargo Prado, pelos conhecimentos sobre *Lactobacillus* e pela utilização dos dados obtidos em sua tese.
- À Mestranda Caroline Yamaguishi pela inestimável ajuda na prática laboratorial.
- Aos professores e funcionários do programa que contribuíram para a minha formação científica, e as demais pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.
- À minha esposa Arlete e filhos Michelle, Thiago, e Debora pelo incentivo e colaboração.
- À minha mãe Wildi, meu irmão Kleber e família pelo estímulo.
- A todos os colegas do mestrado, pelo convívio, ajuda e amizade.
- Ao bom **Deus** por mais esta conquista.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
	1.1 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	3
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
	2.1 UM BREVE HISTÓRICO .....	4
	2.2 MICRORGANISMOS DE INTERESSE NO ESTUDO .....	6
	2.2.1 <i>Probióticos</i> .....	6
	2.2.2 <i>Microrganismos patogênicos</i> .....	9
	2.2.3 <i>Variáveis de interesse</i> .....	11
	2.2.4 <i>O processo de automação</i> .....	15
	2.2.5 <i>Análise de sobrevivência</i> .....	18
	2.2.6 <i>Função de sobrevida</i> .....	19
	2.2.7 <i>Estimador de Kaplan-Meier</i> .....	20
	2.2.8 <i>Teste de “log-rank”</i> .....	20
	2.2.9 <i>Função de risco (hazard)</i> .....	21
	2.3 PRINCÍPIOS E FUNDAMENTOS PARA OS MODELOS BAYESIANOS .....	22
	2.3.1 <i>Rede Bayesiana</i> .....	25
	2.3.2 <i>Técnicas de validação do modelo</i> .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
	3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	29
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
	4.1 MATERIAIS .....	30
	4.1.1 <i>Microrganismos</i> .....	30
	4.1.2 <i>Isolamento e manutenção das cepas isoladas</i> .....	31
	4.1.3 <i>Seleção das cepas</i> .....	32
	4.1.4 <i>Atividade inibitória frente a microrganismos patogênicos</i> .....	32
	4.1.5 <i>Concentração inibitória mínima</i> .....	33

4.2	MÉTODOS .....	34
4.2.1	<i>Planejamento Experimental</i> .....	34
4.2.2	<i>Análise Univariada</i> .....	42
4.2.3	<i>Análise univariada de Cox</i> .....	43
4.2.1	<i>Análise multivariada</i> .....	44
4.3	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA .....	46
4.3.1	<i>Sobrevivência utilizando o sobrenadante neutralizado</i> .....	46
4.3.2	<i>Sobrevivência utilizando o sobrenadante Tal Qual</i> .....	48
4.4	USO DA REDE BAYESIANA .....	50
4.4.1	<i>Construção da Rede Bayesiana</i> .....	51
4.4.2	<i>O aprendizado em redes Bayesianas</i> .....	53
4.4.3	<i>Limitações na estrutura da rede</i> .....	54
4.4.4	<i>Obtenção de probabilidades</i> .....	55
4.4.5	<i>Probabilidades marginais</i> .....	55
4.4.6	<i>Probabilidades Condicionais</i> .....	56
4.4.7	<i>“Noisy-nor”</i> .....	60
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
5.1	DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS SOBRENADANTES TQ E N .....	62
5.2	EFICÁCIA DOS SOBRENADANTES COMO INIBIDORES DE CRESCIMENTO .....	64
5.3	SOBRENADANTE COM TRATAMENTO NEUTRALIZADO .....	64
5.4	ESTUDO UTILIZANDO O TRATAMENTO TQ .....	65
5.5	MODELO FINAL .....	66
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE A – VALORES DE DENSIDADE ÓTICA REFERENTES À</b>		
	<b>UTILIZAÇÃO DO SOBRENADANTE <i>L.acidophilus</i>.</b> .....	<b>82</b>
<b>APÊNDICE B – VALORES DE DENSIDADE ÓTICA REFERENTES À</b>		
	<b>UTILIZAÇÃO DO SOBRENADANTE <i>L. sake</i>.....</b>	<b>84</b>

<b>APÊNDICE C – VALORES DE DENSIDADE ÓTICA REFERENTES À UTILIZAÇÃO DO SOBRENADANTE <i>L.rhamnokus</i>.</b> .....	<b>86</b>
<b>ANEXO A – VALORES DE ABSORBÂNCIA PARA AMOSTRA NEUTRALIZADA</b> .....	<b>88</b>
<b>ANEXO B – VALORES DE ABSORBÂNCIA PARA A AMOSTRA TAL QUAL.</b> .....	<b>96</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Temperaturas importantes para o desenvolvimento de microrganismos Procarióticos. ....	13
Tabela 2 – Microrganismos utilizados no trabalho e respectivas procedências. ....	31
Tabela 3 – Cepas-referência utilizadas nos testes de inibição de microrganismos patogênicos. ....	33
Tabela 4 - Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado de cinco variáveis e três níveis. ....	35
Tabela 5 – Delineamento fatorial fracionado $2^{5-1}$ para o crescimento de microrganismos patógenos após 9 e 24 h de acompanhamento de cinco variáveis e três níveis. ....	36
Tabela 6 – Estimativa dos efeitos para o crescimento dos patógenos. ....	37
Tabela 7- Temperatura (°C) .....	55
Tabela 8 - Tempo (horas) .....	56
Tabela 9 – pH .....	56
Tabela 10 – Aw .....	56
Tabela 11 - Valores de P(A). ....	57
Tabela 12 – Valores das probabilidades condicionais. ....	57
Tabela 13 - Probabilidade conjunta. ....	58
Tabela 14 - Probabilidades condicionais para cada nó. ....	58
Tabela 15 - Utilização dos <i>Lactobacillus</i> em função do tratamento com os sobrenadantes dos <i>Lactobacillus</i> . ....	59



Tabela 16 - Redução do tempo de sobrevida em função do <i>Lactobacillus</i> e do tratamento (Grupo dos microrganismos patogênicos).....	59
Tabela 17- Distribuição da ocorrência de eventos pela estatística de “log-rank”.....	64
Tabela 18 – Estimativas $S(t)$ para a sobrevida dos microrganismos patogênicos com o uso do sobrenadante neutralizado.....	65
Tabela 19 – Estimativas $S(t)$ para os dados do tratamento TQ.....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Variáveis de interesse no estudo e suas iterações. ....	12
Figura 2– Curva de crescimento microbiano baseada no modelo de Gompertz (NAKASHIMA, et al. 2007). ....	16
Figura 3– Curva logarítmica resultante dos parâmetros da equação de Gompertz modificada Gibson (GIBSON et al., 1987). ....	18
Figura 4– Exemplo de uma rede Bayesiana .....	27
Figura 5 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patógenos em estudo, medidos pela absorvância: (a) e (b) temperatura e pH.....	38
Figura 6 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patógenos em estudo, medidos pela absorvância: (c) e (d) temperatura e $A_w$ . ....	39
Figura 7 - Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patógenos em estudo, medidos pela absorvância: (a) e (b) da variável pH e do precipitado. ....	40
Figura 8 - Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patógenos em estudo, medidos pela absorvância: (c) e (d) do pH e do sobrenadante. ....	41

Figura 9 – Resíduos de Schoenfeld para validação do modelo DE Cox Convencional para as variáveis BAL, Ph, Microrganismos patógenos, temperatura e tratamento. ....	45
Figura 10 – Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante <i>L.acidophilus</i> . ....	47
Figura 11 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante <i>L.rhamnosus</i> . ....	47
Figura 12 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante <i>L.sake</i> . ....	48
Figura 13 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante <i>L.acidophilus</i> . ....	49
Figura 14 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante <i>L.rhamnosus</i> . ....	49
Figura 15 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante <i>L.sake</i> . ....	50
Figura 16 – Modelo da rede, construído para pré-selecionar as variáveis Sobrenadantes, Temperatura, pH, Aw, Tempo e microrganismos Patógenos. ....	52
Figura 17 – Rede Bayesiana com quatro nós (pintura gráfica aproximada, por falta de resolução). ....	57
Figura 18 - Ocorrência de falha (•) ou censura (o) dos microrganismos. ....	61

Figura 19 - (a) Sobrevida dos microrganismos patógenos mediante a utilização do sobrenadante neutralizado; (b) utilização do sobrenadante TQ.....	62
Figura 20 - Modelo construído de acordo com as variáveis pré-selecionadas.....	67
Figura 21 - Modelo utilizando <i>L. acidophilus</i> , com o tratamento TQ em 3 h.....	68
Figura 22 - Modelo utilizando <i>L. acidophilus</i> , tratamento TQ, em 6 h.....	69
Figura 23 - Modelo utilizando <i>L. acidophilus</i> , tratamento neutralizado, em 3 h. ....	70
Figura 24 - Modelo utilizando <i>L. acidophilus</i> , tratamento neutralizado, em 6 h. ....	71

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Simulação das probabilidades de sobrevivência dos microrganismos patógenos pela rede Bayesiana.....	72
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection.
BAL	Bactérias ácido-láticas.
DEEBB	Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Da Universidade Federal da Paraná.
pH	potencial hidrogeniônico.
Aw	Atividade de água.
MRS	caldo de cultura □gar, Man, Rogosa e Sharp (1960).
TPY	caldo de cultura denominado por Scardovi (1986).
HPLC	“High performance liquid chromatography”.
MH	Caldo Mueller-Hinton.
CIM	Concentração inibitória mínima.
TQ	Talqual – equivale ao sobrenadante produzido, sendo Esterilizado em membrana dês éster de celulose de 0,22 µm de poro e recolhida em microtubo estéril.
N	Neutralizada (N), sobrenadante com pH 6,0, com NaOH 1 N, tendo sido posteriormente filtrado em membrana de éster de celulose de 0,22 µm.
g	Gramas.
mL	Mililitro.
O <sub>2</sub>	Oxigênio.
t	Tempo.
GRAS	“Generally Recognised As Safe”.
DCCR	Delineamento Completamente Casualizado Reduzido.

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

$\alpha$	Coeficiente de significância
O <sub>2</sub>	Oxigênio
g	Grama
%	Porcentagem
mL	Mililitros
rpm	Rotações por minuto
°C	Grau Celsius
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
$\Theta$	Espaço paramétrico
$\mu$	Tempo de geração de uma célula
t	Intervalo de tempo
nm	Nanometro
NaCl	Cloreto de sódio

## RESUMO

Neste trabalho são apresentados estudos e aplicações de um modelo estatístico para avaliar o crescimento e inibição de microrganismos patogênicos pelos metabólitos exógenos presentes nos sobrenadantes do cultivo de bactérias ácido-láticas. O trabalho envolveu a interação entre diferentes áreas do conhecimento, biotecnologia, matemática e estatística, com maior foco na metodologia de análise do crescimento microbiano com a utilização de sistemas computacionais cujo objetivo é simular as decisões preditas que poderão ser tomadas por especialistas em processo biotecnológicos. São apresentados os métodos de definição do problema, modelagem qualitativa e quantitativa, e avaliação. Os estudos de modelagem e avaliação foram realizados com o auxílio de uma parte experimental desde a inoculação até a contagem dos microrganismos. São apresentados como resultados a rede Bayesiana construída sobre os dados obtidos e um modelo que determina a probabilidade de sobrevivência de microrganismos patogênicos em diferentes condições de atividade de água, pH, temperatura e concentração de inibidores em função do tempo, para a aplicação das técnicas estatísticas de análise de sobrevivência e o emprego de redes Bayesianas para inferência dos resultados, visando estimação e/ou predição da vida de prateleira e a segurança dos alimentos.

**Palavras-chave:** Microbiologia preditiva. Modelagem estatística. Redes Bayesianas. Análise de sobrevivência.



## ABSTRACT

In this work are presented studies and application of statistical model for evaluate the growth and inhibition of pathogenic microorganisms by exogen metabolits presented in broth of latic acid bacteria. The work involved the interaction between different areas of knowledge, biotechnology, mathematics and statistics, with bigger focus in the methodology of analysis of microrganism growth using computational systems whose objective is to simulate the predicted decisions that they could be taken by biotechnological specialists in process. The methods of problem definition, qualitative and quantitative modeling, and evaluation are presented. The studies of modeling and evaluation had been carried through with the aid of an experimental part since the inoculation until the counting of the microorganism. They are presented as resulted the Bayesian net constructed on the gotten data and a model that determines the probability of survival of pathogenic microorganism in different conditions of water activity, inhibitor pH, temperature and concentration in function of the time, for the technique statistics of analysis of survival with Bayesian approach, aiming estimation and/or predict the shelf life and safety of Food.

**Keywords:** Predictive microbiology. Statistics modeling. Bayesians nets. Survival analysis.

## 1 INTRODUÇÃO

Em estudos realizados sobre o efeito e o modo de ação das substâncias com propriedades antimicrobianas presentes nos alimentos ou adicionadas durante o processo de fabricação, pode-se perceber que o comportamento dos microrganismos é, também, determinado pelas características específicas do meio (por exemplo: atividade de água, temperatura e pH) e, por aquelas inerentes ao efeito bactericida das culturas adicionadas. As bactérias ácido-láticas (BAL) são exemplos destas culturas que, além de possuírem características sensoriais, permitem uma maior conservação dos alimentos podendo, ainda, ser usadas como probióticos. Ou seja, bactérias vivas contidas nos alimentos e que, após a ingestão, exercem efeitos benéficos ao hospedeiro. Os microrganismos mais comuns encontrados nos alimentos como probióticos são os lactobacilos e as bifidobactérias (CEBECL; GUARAKAN, 2003). Para que o probiótico produza benefícios terapêuticos, é recomendado que o alimento tenha, aproximadamente,  $10^6$  microrganismos vivos por g ou mL do produto no momento do consumo (SHAH, 2000).

As BAL são caracterizadas como Gram positivas, não esporulantes e, normalmente, não-móveis, que produzem ácido lático como o maior ou o único produto de fermentação da glicose. Crescem anaerobicamente, porém, a maioria, não é sensível ao  $O_2$  e podem crescer tanto em sua presença quanto em sua ausência, sendo, então, denominados anaeróbios aerotolerantes (BROCK et al., 1994).

O acompanhamento do processo evolutivo microbiano é, também, motivo de muitas pesquisas na área de Biotecnologia, sendo, a maioria, fundamentada em modelos matemáticos baseados nas leis das probabilidades, procurando parametrizar a

seqüência de identificação, isolamento e quantificação da atividade inibidora da bacteriocina em diferentes condições físico-químicas e ambientais.

Um dos objetos deste estudo é a análise de sobrevivência, a qual parte do princípio de que o efeito das propriedades temporais e do meio (temperatura, atividade de água, pH, tipo de cultura, entre outros) podem ser previstos por modelos estatísticos. Em análise de sobrevivência, a variável resposta é, geralmente, o tempo até a ocorrência de um evento de interesse. Este tempo é denominado tempo de falha, que no caso caracteriza o tempo até a morte dos microrganismos em estudo. O termo “falha” surgiu no contexto de análise de confiabilidade, na qual se busca modelar o tempo até a falha de algum equipamento ou componente. Quando se tem uma perda de informação decorrente de não se ter observado o tempo do indivíduo que pertence ao grupo em estudo, diz-se que houve uma censura ou truncamento. O truncamento significa que os indivíduos que, naturalmente, pertenceriam à população estudada não foram incluídos no estudo (CARVALHO, 2005).

Toda e qualquer informação que se tenha sobre uma determinada quantidade de interesse é fundamental em Estatística. O verdadeiro valor, muitas vezes desconhecido, é investigado utilizando-se diferentes parâmetros com, também, diferentes graus de incerteza e, por isso são, normalmente, representados pelos modelos probabilísticos. Este é o princípio de um dos modelos estatísticos que será utilizado neste trabalho, o método Bayesiano. O método Bayesiano utiliza o teorema de Bayes como fundamento quantitativo para a revisão de probabilidades conhecidas, com base em uma nova informação amostral.

## 1.1 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Para atender aos objetivos propostos, este trabalho foi estruturado em sete capítulos, sendo o primeiro a sua Introdução.

O segundo capítulo contém a revisão da literatura, onde estão abordados aspectos sobre os modelos estatísticos utilizados para descrever o comportamento dos microrganismos em um determinado meio. Uma revisão mais aprofundada é feita em relação às técnicas de análise de sobrevivência, contabilizando além do tempo, a duração de uma determinada condição, ou seja, a probabilidade de que uma cultura patogênica específica sobreviva por mais de  $t$  unidades de tempo, na presença de variáveis inibidoras do crescimento da colônia.

No terceiro capítulo, estão detalhados os objetivos a serem atingidos na pesquisa.

No quarto capítulo, estão apresentados os materiais utilizados (softwares, culturas, etc.) e descritas as metodologias experimentais empregadas para a avaliação dos métodos propostos.

O quinto capítulo se inicia com a apresentação dos resultados, seguido das respectivas avaliações realizadas pelos modelos estatísticos propostos.

O sexto capítulo traz as conclusões do trabalho e comentários adicionais sobre os resultados.

E, finalmente, no sétimo capítulo encontram-se apresentadas sugestões para novos estudos e trabalhos futuros.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo estarão descritos os fundamentos técnico-científicos encontrados na literatura e que servem de base para o desenvolvimento do presente trabalho.

### 2.1 UM BREVE HISTÓRICO

A tecnologia de produção e processamento de alimentos teve que ser modernizada para atender às exigências oriundas dos novos mercados e consumidores a partir da década de 20. Nesta época, surgiu a necessidade da introdução de técnicas para a conservação e a segurança dos produtos com a eliminação de microrganismos que pudessem interferir na vida útil dos alimentos ou causar doenças à população. Alguns recursos utilizados para a eliminação ou controle destes microrganismos nos alimentos, incluíram: tratamento térmico, adição de conservadores químicos, refrigeração durante o armazenamento, utilização de substâncias que prolongassem a vida útil do produto, entre outros (BUCHANAN, 1993).

Estes fatores modificaram o perfil das indústrias que não mais pararam de investir em capacitação tecnológica, até porque, necessitavam simular processos que permitissem acompanhar o comportamento dos microrganismos em condições naturais de fabricação, distribuição e armazenamento dos alimentos (McMEEKIN, 1993).

Em 1920, com o objetivo de calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos, iniciou-se o uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos (ROSS, McMEEKIN, 1994).

Estes modelos revolucionaram a indústria de enlatados (GOLDBLITH et al., 1961). Porém, até a década de 80, a aplicação de técnicas para descrever o crescimento e a sobrevivência de microrganismos em alimentos não recebeu muita atenção (ROSS, McMEEKIN, 1994). Somente algumas companhias do ramo alimentício no Canadá, nos Estados Unidos e na Inglaterra utilizavam a modelagem em suas operações (FARBER, 1986).

A partir de 1983, o potencial da microbiologia preditiva começou a atrair interesse em pesquisa e financiamento, particularmente nos Estados Unidos e Reino Unido e, também, na Austrália e Europa (ROSS, McMEEKIN, 1994). Um software denominado “Food Micromodel”, desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (“Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food”, MAFF) na década de 80, descreveu a resposta de crescimento, morte e sobrevivência de patógenos de origem alimentar, em relação a vários fatores ambientais.

Pesquisas no campo de microbiologia de alimentos desenvolvidas pela Unidade de Pesquisa em Segurança Alimentar Microbiológica do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (“United States Department of Agriculture”, USDA), no final dos anos 80, resultaram no desenvolvimento do software “Pathogen Modeling Program – PMP”.

A Europa também demonstrou interesse no conceito de modelagem preditiva, concentrando esforços de, aproximadamente, 30 laboratórios em 10 países da Comunidade Econômica Européia, resultando no “Food Linked Agricultural and Industrial Research, FLAIR”, um programa desenvolvido para avaliar o crescimento de organismos deteriorantes e patogênicos em uma grande variedade de produtos naturais (McMEEKIN et al., 1993). No Reino Unido e nos Estados Unidos foi criado, por intermédio dos programas de modelagem, um banco de dados com

cálculos para modelos de crescimento para 10 patógenos; modelos de sobrevivência para 4 patógenos; modelos de tempo de destruição térmica para 5 patógenos; e, modelos de tempo de crescimento para tipos proteolíticos e não-proteolíticos de *Clostridium botulinum* (“WHITING and BUCHANAN”, 1997).

Segundo McMeekin et al. (1993), dois foram os fatores que contribuíram para o interesse da aplicação da microbiologia preditiva: i) importantes surtos de intoxicação alimentar durante a década de 80, tendo como veículo os hambúrgueres; e, ii) a conscientização, por parte de muitos microbiologistas de alimentos, da limitação dos métodos tradicionais para segurança e qualidade dos alimentos.

## 2.2 MICRORGANISMOS DE INTERESSE NO ESTUDO

Neste sub item serão apresentados os principais microrganismos trabalhados pela indústria alimentícia e de grande importância na produção, distribuição e armazenamento da cadeia alimentar.

### 2.2.1 Probióticos

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Ao longo do tempo, esta denominação teve diferentes acepções. Lilly e Stillwel (1965) usaram-na para denominar substâncias secretadas por um protozoário que estimulavam o crescimento de outros, e Parker (1974), para denominar suplementos alimentares destinados a animais, incluindo microrganismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal.

Os principais microrganismos com propriedades probióticas são as bactérias lácticas que apresentam algumas características comuns, a saber: são Gram positivas, normalmente catalase negativa, asporogênicas, desprovidas de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e produtoras de ácido láctico (FERREIRA, 2003; GOMES et al., 1999). As bactérias lácticas, por intermédio da fermentação, transformam alguns açúcares, especialmente, a lactose, em ácidos orgânicos tais como os ácidos láctico e acético.

De acordo com Ferreira (2003) o termo “bactéria ácido láctica” inclui, atualmente, 15 gêneros: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são correntemente utilizados em preparações probióticas em grau tecnológico sendo não-patogênicas e consideradas como “Generally Recognised As Safe”, GRAS (GOMES et al., 1999).

#### 2.2.1.1 *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)

Isolado pela primeira vez por Moro (1900) a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno; este investigador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais. Estes microrganismos são, geralmente, caracterizados como gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar e aerotolerantes ou anaeróbios. É um bacilo gram-positivo com pontas arredondadas, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, com tamanho típico de 0,6 a 0,9 µm de largura e 1,5 a 6,0 µm de comprimento. Esta espécie tem a particularidade de ser pouco tolerante à



salinidade do meio, e ser microaerofílica, com o crescimento em meios sólidos favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio.

#### *2.2.1.2 Lactobacillus sake (L. sake)*

Apresentam-se em forma de bastões com terminações rombudas, com 0,6 a 0,8 µm de largura por 2,0 a 3,0 µm de comprimento, ocorrendo individualmente ou em pequenas cadeias. Durante a fase estacionária de crescimento podem mostrar-se ligeiramente curvos e irregulares. Algumas cepas crescem em temperatura ao redor de 2 a 3 °C. A maioria das cepas produz L(+) ácido láctico em caldo MRS, sendo que algumas produzem ácido láctico inativo neste meio (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

#### *2.2.1.3 Lactobacillus rhamnosus (L. rhamnosus)*

É um microrganismo residente, encontrado tanto no intestino delgado quanto no trato vaginal. Já se comprovou eficaz na inibição das infecções do trato vaginal e urinário e na produção de imunidade contra vírus e bactérias patogênicas. O *L. rhamnosus* é muito prolífico, tem alta resistência aos sais biliares, adere à mucosa intestinal e protege o trato intestinal contra a invasão e atividades de microrganismos nocivos. Ele também cria condições favoráveis para a implantação de bifidobactérias e produz o ácido láctico L(+) biologicamente desejável.

## 2.2.2 Microrganismos patogênicos

### 2.2.2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Como as salmonelas e as shigelas a *E. coli* pertence à família das Enterobactérias, sendo, no entanto, incluída no grupo coliforme que se caracterizam por bactérias que fermentam a lactose, com produção de gás. As cepas envolvidas em processos patogênicos são morfológicas e bioquimicamente indistinguíveis das não-patogênicas. Diversos tipos de alimentos têm sido citados em casos de surtos infecciosos atribuídos a este microrganismo. Medidas de controle para a *E. coli* são as mesmas atribuídas às outras enterobactérias, constituindo em higiene rigorosa de pessoal, equipamentos e utensílios, principalmente, em alimentos infantis.

*E. coli* é a espécie predominante entre os diversos microrganismos anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. Esse microrganismo pertence à família *Enterobacteriaceae* e, entre suas principais características, destacam-se: bacilos Gram(-), não-esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta, também, a lactose, com produção de ácido e gás, embora alguns sejam anaerogênicos apresentam antígenos somáticos O, relacionados com proteínas dos flagelos e, ainda, antígenos K, relacionados com polissacarídeos capsulares. Foram descritos, até o momento, 173 antígenos O, 56 H e 100 K diferentes (GLASS et al., 1991).

O significado da presença de *E. coli* em um alimento deve ser avaliado sob dois ângulos. Inicialmente, por ser uma enterobactéria, uma vez detectada, indica que o alimento tem uma contaminação de origem fecal (KUNTZ, 1999) e, portanto, está em

condições higiênicas insatisfatórias. O outro aspecto a ser considerado é que as suas diversas linhagens são, comprovadamente, patogênicas para o homem (LEVINE,1987) e para os animais (BETTELHEIM, 2002).

#### 2.2.2.2 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

São cocos agrupados em cachos de uva, Gram (+), algumas cepas produzem toxina, anaeróbio facultativo, mas prefere a aerobiose; se desenvolve em pH entre 4,2 e 9,3, tendo como ótimo o pH 7,0; a temperatura oscila entre 6,5 e 45 °C (sendo considerada ótima entre 30 e 37 °C); e, a atividade de água mínima de 0,86. São halofílicos e osmofílicos e tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas.

O *S. aureus* é comumente encontrado na pele e mucosas de humanos e animais de sangue quente. De acordo com o “Bergey’s Manual of determinative bacteriology” (1994), 19 espécies fazem parte deste gênero. Destas, as seguintes apresentam interesses potenciais em microbiologia de alimentos: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogens* e *S. intermedius*, sendo, o *S. aureus*, o mais importante. Com exceção de *S. chromogens*, as demais espécies apresentam testes positivos para coagulase (plasma de sangue de coelho) e termonuclease (Tnase).

O *S. aureus* encontrado em vários tipos de alimentos é facilmente transmissível quando a higiene pessoal deixa a desejar. A sua presença em alimentos pode significar que as operações na sua manipulação foram desenvolvidas em condições insatisfatórias do ponto de vista sanitário, sendo a origem da contaminação os manipuladores, utensílios e equipamentos. Entre os principais alimentos estão os de origem animal industrializados (frango, carne, presunto, leite, queijos, etc.), e aqueles com maior

manipulação como saladas, doces com ou sem recheio, entre outros. Algumas cepas de *S. aureus* são produtoras de toxinas, isto quando atingem um número de 1.000.000 de unidades ou mais de células viáveis por grama de alimento em condições ótimas. A enterotoxina resultante torna-se evidente entre 4 a 6 h.

#### 2.2.2.3 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)

As toxinas são termo-estáveis resistindo até 100 °C por 60 minutos, enquanto que as células morrem em 2 minutos a 65,5 °C. Além do homem, a maioria dos animais domésticos também é portadora ou apresenta-se contaminada pela bactéria.

Devido à ampla distribuição no meio ambiente, habilidade de sobreviver em condições adversas, resistência a diversos antibióticos e capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, a *L. monocytogenes* tornou-se um importante patógeno de origem alimentar. A associação entre produtos cárneos e casos de listeriose, nos países desenvolvidos e, o fato do microrganismo ser isolado com freqüência, a partir destes produtos no varejo, indicam que os produtos refrigerados e pratos prontos congelados e, inadequadamente, re-aquecidos, pode constituir um risco para a Saúde Pública. Este risco é, potencialmente, maior em produtos que não são aquecidos antes da ingestão.

#### 2.2.3 Variáveis de interesse

Como variáveis de interesse para os microrganismos, destacam-se aquelas apresentadas na Figura 1, sendo a temperatura ambiente, o pH da solução de cultura e, em muitos casos, a atividade da água.

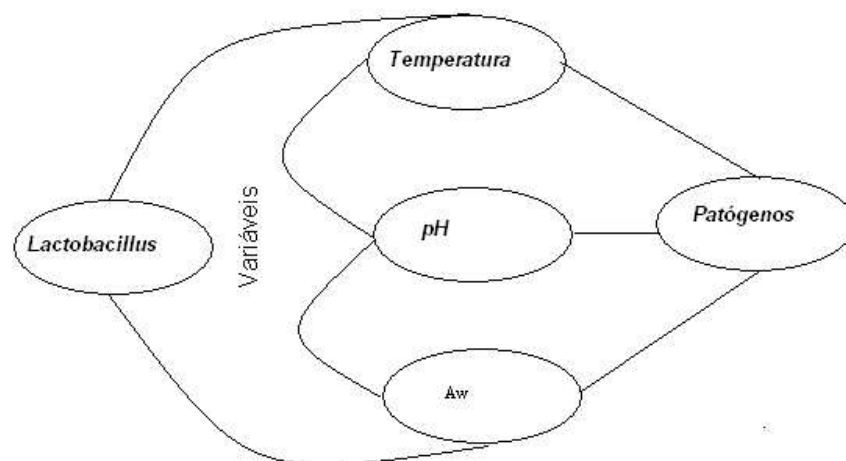


Figura 1 – Variáveis de interesse no estudo e suas interações.

Fonte: Autor (2007).

### 2.2.3.1 Temperatura

A temperatura influencia de forma decisiva o crescimento da atividade microbiana nos alimentos. Segundo estudos de outros pesquisadores (FU et al.,1991), as bacteriocinas produzidas por cepas de *L. acidophilus* são, em geral, resistentes aos tratamentos térmicos mais severos (BAREFOOT; KLAENHAMMER, 1983; HUMCHALOVÁ; JOSEPHSEN; PLOCKOVÁ, 1998). Tal fator interfere na duração da fase de latência, na velocidade de crescimento e no número final de células. A temperatura contribui na determinação da microbiota contaminante, conforme listado na Tabela 1. Quando os alimentos são refrigerados e mantidos à temperaturas adequadas, a deterioração somente ocorrerá em função dos psicotróficos (ICMSF, 1980).

Tabela 1 - Temperaturas importantes para o desenvolvimento de microrganismos Procarióticos.

Grupos	Faixa de temperatura (°C)		
	Mínima	Ótima	Máxima
Termófilos	40 - 45	55 - 75	60 - 90
Mesófilos	5 - 15	30 - 45	35 - 47
Psicrófilos	-5 - 5	12 - 15	15 - 20
Psicrotróficos	-5 - 5	25 - 30	30 - 35

FONTE:ICMSF, 1980

### 2.2.3.2 pH

A maioria das espécies bacterianas pode crescer em meios cujo pH esteja entre 5 e 9. Nesta faixa, encontra-se na maioria dos ambientes naturais. Também, uma parcela destas bactérias não crescem em valores de pH com uma unidade acima ou abaixo do seu pH ótimo. Quanto à tolerância ao pH, as bactérias podem ser classificadas em 3 categorias:

- neutrófilas: espécies que crescem em faixas de pH entre 5,4 e 8,5. Boa parte das bactérias (inclusive as patogênicas) apresenta um crescimento ótimo em ambientes cujo pH se aproxima da neutralidade.
- acidófilas: espécies que crescem em faixas de pH extremamente baixas, entre 0,1 e 5,4. Um exemplo é a bactéria acidófila *Helicobacter pylori* que pode colonizar a parede estomacal. Algumas bactérias que oxidam enxofre a ácido sulfúrico podem gerar e tolerar condições em torno de pH 1.

- alcalinófilas: espécies que crescem em faixas de pH entre 8,5 e 11,5. A bactéria *Vibrio cholerae* apresenta um crescimento ótimo em pH 9. A bactéria oportunista *Alcaligenes faecalis* pode criar e tolerar condições alcalinas com pH 9 ou maior.

### 2.2.3.3 Atividade de água

A água, que representa 80 a 90% da total da célula, é um outro fator do meio que afeta o crescimento microbiano. Além da função ligada ao metabolismo celular e aos nutrientes, a água influencia o crescimento por meio da pressão osmótica e da pressão hidrostática.

A característica físico-química que reflete esta propriedade satisfatória ou não de crescimento microbiano é denominada de atividade de água. Seu conceito está ligado ao fato da água, se apresentar em duas formas distintas (FRANCO; LANDGRAF, 1996; PELCZAR et al., 1996, PARDI et al., 2001):

- água livre: é aquela que se encontra fracamente ligada ao substrato. Trata-se de um simples solvente e pode ser facilmente congelada e evaporada, permitindo o desenvolvimento microbiano;
- água combinada: que se encontra fortemente ligada ao substrato. Não se trata de um solvente e é, dificilmente, congelada e evaporada, não permitindo o desenvolvimento microbiano.

No caso, o teor de água de um alimento indica a quantidade total de água, mas não permite distinguir se esta água está livre ou combinada a algum substrato, sendo que quanto maior a quantidade de água livre, maior será o crescimento microbiano e as ocorrências de reações químicas diversas

#### 2.2.4 O processo de automação

Buchanan (1993) apontou a crescente facilidade de acesso aos computadores como fator preponderante para a maior utilização das metodologias de modelagem preditivas. O marco inicial para o rápido desenvolvimento de softwares para a modelagem preditiva, foi o artigo publicado em 1983 por Roberts e Jarvis (ROSS; McMEEKIN, 1994). Neste artigo foi questionado o conhecimento que se observa a partir da abordagem tradicional da microbiologia de alimentos na obtenção de respostas de crescimento dos microrganismos, ao longo da distribuição, venda e estocagem do produto ou até mesmo, após a ocorrência de um episódio de contaminação alimentar. Estes softwares, apesar de sua aproximação precisa, não contemplam a influência de outros fatores no crescimento e morte dos microrganismos existentes nos alimentos, senão aqueles já em muito estudados e difundidos.

Recentes estudos (FERREIRA, 2003) mostraram que as técnicas que exploram as atividades antagônicas de bactérias produtoras de bacteriocinas ou que acrescentam sabor quando inoculadas ou já existente na microbiota natural, podem contribuir para a conservação, aparência e sabor do produto. Todos estes quesitos devem, também, ser explorados e inseridos no contexto da modelagem, fornecendo melhores subsídios ao estudo da vida útil do produto.

O modelo matemático, mais amplamente utilizado para traçar curvas de crescimento microbiano, sob condições ambientais definidas e controladas, é baseado na Equação (1) de Gompertz (WHITING; BUCHANAN,1993), descrita como:

$$N_t = C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\} \quad \text{Equação (1)}$$



Onde:

- $N_t$ , a densidade da população no tempo,  $t$ ;
- $C$ , é o valor da assíntota superior, isto é, a densidade máxima da população indicada por  $N(+\infty)$ ;
- $M$ , é o tempo no qual a velocidade absoluta de crescimento é máxima; e,
- $B$ , é a velocidade de crescimento relativa no tempo  $M$ .

A curva de crescimento de Gompertz, resultante desta equação utilizada em sua modelagem a distribuição exponencial e a sua derivada tem características desejáveis para descrever o crescimento microbiano, conforme apresentado na Figura 2.

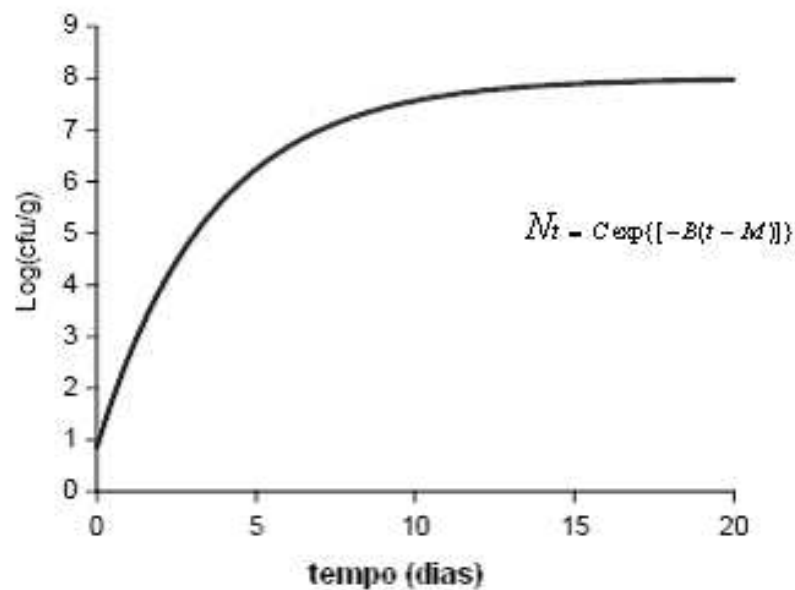


Figura 2– Curva de crescimento microbiano baseada no modelo de Gompertz (NAKASHIMA, et al. 2007).

Embora seja matematicamente possível obter do modelo exponencial a premissa de risco constante em função do tempo, este recurso é muito pouco utilizado na maioria dos fenômenos biológicos. Em determinadas situações, porém, o modelo exponencial pode ser uma aproximação válida. Quando o tempo de

acompanhamento é curto o suficiente para que os fatores de risco naquele período, possam ser considerados constantes, assume-se que não há influência na sobrevivência. Tal procedimento implica em um crescimento infinito da colônia de microrganismos, sem levar em conta a escassez do substrato, o acúmulo de substâncias tóxicas e a conseqüente morte celular em função da maturidade da cepa. Para minimizar a influência de tais efeitos no modelo de Gompertz, foram introduzidos novos parâmetros de controle na Equação (1) (GIBSON et al., 1987), conforme apresentado na Equação (2).

$$\text{Log}N_t = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

- $N_t$  e  $t$ , têm o mesmo significado da equação anterior;
- $A$ , é o valor da assíntota inferior, isto é, aproximadamente, o log do número inicial de bactérias  $\log N(-\alpha)$ ;
- $C$ , é o valor da assíntota superior, isto é  $\log N(+\alpha)$  (log da população na fase estacionária menos o log da contagem inicial);
- $M$ , é o tempo na qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima; e,
- $B$ , é a velocidade de crescimento relativa ao tempo,  $M$ .

A curva resultante, apresentada na Figura 3, leva em consideração a fase lag e descreve uma curva sigmóide assimétrica (WHITING; BUCHANAN, 1997).

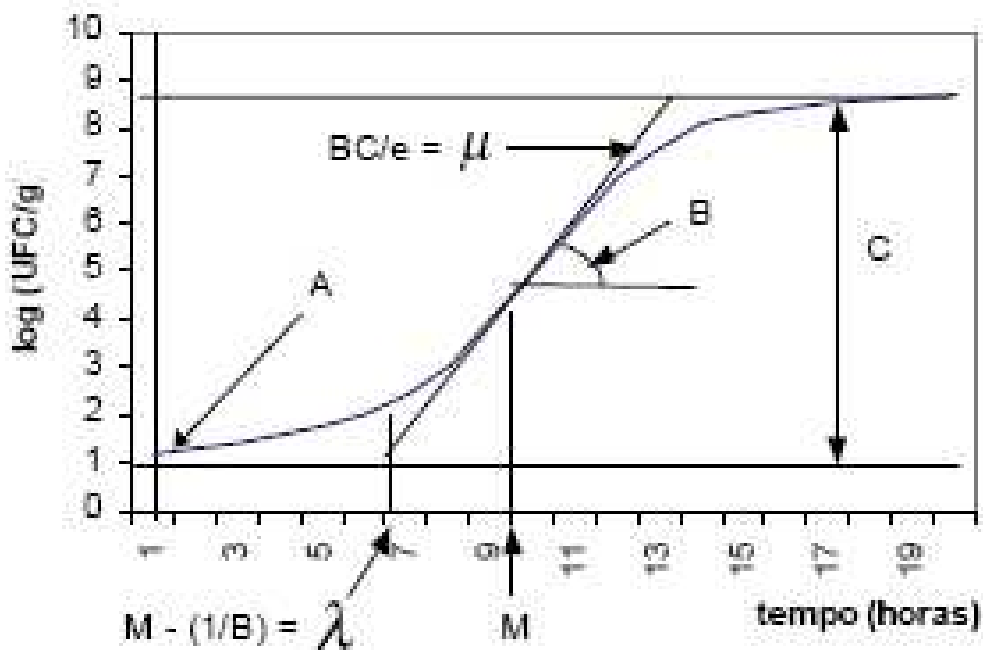


Figura 3– Curva logarítmica resultante dos parâmetros da equação de Gompertz modificada Gibson (GIBSON et al., 1987).

Sendo:

- M, a velocidade de crescimento; e,
- $\lambda$ , a duração da fase lag;  $M - (1/B) + (\log N_0 - A) / (BC/e)$  segundo McMeekin et al., (1993), sendo esta a melhor forma de calcular a duração da fase lag.

### 2.2.5 Análise de sobrevivência

Análise de sobrevivência é um termo usado para descrever os dados que medem o tempo até a ocorrência de um determinado evento de interesse a partir de um tempo inicial pré-estabelecido. Particularmente, em estudos biotecnológicos este eventos de interesse, podem ser:

- o tempo decorrido até a morte de um microrganismo;
- o tempo de crescimento de uma certa cultura; e,

- o tempo até a escassez do substrato.

Em análise de sobrevivência, o termo tempo de falhas é comumente encontrado em diversas áreas de pesquisa. Por falha entende-se a ocorrência de um evento pré-especificado e, por tempo de falhas, o período de tempo até que ocorra uma falha. A possibilidade de que alguns indivíduos estejam livres do evento, por terem sido retirados antes do término, ou, não haver adquirido a característica em estudo até o término do experimento, é dado o nome de censura (COLOSSIMO; GIOLO, 2006).

Em algumas situações, a variável resposta tempo de falha pode estar sendo afetada por variáveis latentes, as quais podem descrever as influências do meio, das condições físicas ou ainda de co-variáveis não contempladas no estudo.

Alguns modelos com variáveis latentes envolvem tempos de falha multivariados. Tais tempos aparecem quando existe algum agrupamento natural ou artificial de indivíduos que são correlacionados entre si. Em estudo com animais, é natural supor que exista dependência entre os tempos dos elementos de uma mesma ninhada. Em estudos microbiológicos, é razoável que exista correlação entre os tempos de sobrevivência de uma colônia de microrganismos. As associações aparecem devido a influências de antagonismos entre microrganismos e, também, em função de fatores ambientais compartilhados, principalmente, se forem ignoradas as inferências incorretas.

#### 2.2.6 Função de sobrevivência

A função de sobrevivência  $S(t)$ , definida como a probabilidade de um microrganismo sobreviver por mais de um determinado tempo  $t$  (Equação (3)) se caracteriza por começar sempre com  $S(0) = 1$ , ou seja, a probabilidade de um microrganismo estar vivo no início do

experimento, isto é, no tempo 0 é 1. À medida que o tempo de observação aumenta,  $S(t)$  decresce ou permanece constante.

$$S(t) = \Pr(T > t) \quad \text{Equação (3)}$$

A partir da função de sobrevivência é possível calcular os percentuais de  $T$ , ou seja, a probabilidade de um microrganismo estar vivo, após 25%, 50%, 75%, etc., do tempo total de observação.

### 2.2.7 Estimador de Kaplan-Meier

O estimador de Kaplan-Meier utiliza os conceitos de independência de eventos e de probabilidade condicional. Isto, para desdobrar a condição de sobreviver até o tempo  $t$ , em uma seqüência de elementos independentes que caracterizam a sobrevivência em cada intervalo de tempo anterior a  $t$  e, cuja probabilidade é condicional aos que estão em risco em cada período. A quantidade de microrganismos no grupo de risco no tempo  $t$ , foi estimada pelo número de microrganismos sobreviventes até aquele tempo ( $R(t_i) - \Delta N(t_i)$ ) sobre os que estavam em risco naquele tempo ( $R(t_i)$ ). O estimador da função  $S(t)$  é o produto das probabilidades de sobrevivência a cada tempo  $t_i \leq t$ , conforme apresentado na Equação (4).

$$\hat{S}_{KM}(t) = \prod_{i: t_i \leq t} \frac{R(t_i) - \Delta N(t_i)}{R(t_i)} \quad \text{Equação (4)}$$

### 2.2.8 Teste de “log-rank”

O teste de “log-rank” compara a distribuição da ocorrência dos eventos observados em cada estrato com a distribuição que

seria esperada se a incidência fosse igual em todos os estratos. Se a distribuição observada, for equivalente à distribuição esperada, a curva de sobrevivência dos microrganismos pertencentes ao estrato será equivalente à curva de sobrevivência dos microrganismos em geral (a co-variável não tem efeito na sobrevida).

Sendo  $E_1$ , o total de eventos esperados no estrato 1 e  $O_1$  o total de eventos observados no estrato 1, a estatística log-rank (PETO et al., 1977) é calculada a partir da diferença entre o número total de eventos observados e o número total de eventos esperados, conforme Equação (5), a qual segue uma distribuição qui-quadrado com um grau de liberdade.

$$\text{Log-rank} = \frac{(O_1 - E_1)^2}{\text{Var}(O_1 - E_1)} \quad \text{Equação (5)}$$

A variância que entra no cálculo como um fator de padronização, tem a fórmula (para  $k=2$ ) apresentada na Equação (6):

$$\text{Var}(O_1 - E_1) = \sum_t \frac{R_1(t)R_2(t)\Delta N(t)[R(t) - \Delta N(t)]}{R(t)^2[R(t) - 1]} \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo:

- $\Delta N(t)$ , o número total de eventos observados;
- $R_k(t)$ , o número de indivíduos em risco no estrato  $k$ ; e,
- $R(t)$ , o número total de indivíduos em risco no estudo.

### 2.2.9 Função de risco (hazard)

A função de risco,  $\lambda(t)$ , é definida como o risco instantâneo de um microrganismo sofrer o evento entre o tempo  $t$  e  $t+\varepsilon$ , dado

que ele sobreviveu até o tempo  $t$ . Como  $\varepsilon$ , o incremento de tempo considerado, pode ser infinitamente pequeno, a função de risco expressa o risco instantâneo de ocorrência de um evento, dado que até então o evento não tenha ocorrido.

$$\lambda(t) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\Pr((t < T < t + \varepsilon) \setminus T > t)}{\varepsilon} \quad \text{Equação (7)}$$

Sendo:

- Pr, função probabilidade de risco;
- T, tempo total; e,
- t, o tempo parcial.

## 2.3 PRINCÍPIOS E FUNDAMENTOS PARA OS MODELOS BAYESIANOS

Os métodos Bayesianos (BAYES, 1763) possibilitam a representação numérica do grau de certeza sobre um evento e a manipulação conforme a regra da teoria de probabilidades em que, dados dois eventos A e B, pode-se condicionar A em função da ocorrência de B. Quando não se tem o dado ou fato suficiente para mensurar a frequência de um evento, sua probabilidade pode ser atribuída por intermédio de um julgamento humano, desde que este julgamento seja feito de forma honesta. A probabilidade condicional é dada na Equação (8).

$$P(A_i \setminus B) = \frac{P(A_i \cap B)}{P(B)}, P(B) > 0 \quad \text{Equação (8)}$$

Ou seja,  $P(A \setminus B)$  representa a probabilidade do evento A condicionado à ocorrência de um evento B. Se, é buscado o

número de pontos no espaço amostral, na verdade, busca-se a fração de eventos B que esteja contido em A.

Deste modo, o espaço amostral  $\Theta$  passa a ser o universo B, ou seja, muda-se o foco do universo total para somente uma porção do espaço.

Pela Equação (9) verifica-se o condicionamento de uma variável à outra, ou seja, o resultado final depende da influência de outras variáveis.

O grau de certeza de um determinado evento em um espaço amostral pode ser medido pelo teorema de Bayes. O teorema de Bayes, também conhecido de teorema da causa e efeito, é utilizado para calcular a *posteriori*, pois sua aplicação ocorre após o acontecimento de um evento associado ao espaço amostral.

Dois eventos A e B são independentes se a ocorrência de A não é informativa para a ocorrência de B e vice-versa. Assim, se A é independente de B, então, pela Equação (10):

$$P(A \setminus B) = P(A) \quad \text{Equação (9)}$$

Onde:

$$P(A \setminus B) = \frac{P(A)P(B)}{P(B)} = P(A) \quad \text{Equação (10)}$$

A probabilidade conjunta de A e B é dada pela Equação (11).

$$P(A \cap B) = P(A \setminus B)P(B) \quad \text{Equação (11)}$$

Se A for independente de B, então se deduz a Equação (12).

$$P(A \cap B) = P(A)P(B) \quad \text{Equação (12)}$$



A Equação (12) define a relação de independência entre dois eventos (caso dois eventos não satisfaçam esta condição, então não são independentes).

Supondo-se o conhecimento das relações de dependência entre as variáveis,  $x_1, \dots, x_n$  de um problema, calcula-se a probabilidade conjunta global sobre todas as variáveis  $x_1, \dots, x_n$  do mesmo, utilizando-se a regra da cadeia, dada pela Equação (13).

$$P(x_1, \dots, x_n) = \prod_{i=1}^n P(x_i \mid \prod_{j=1}^{i-1} x_j) \quad \text{Equação (13)}$$

Onde:

$\prod_{j=1}^{i-1} x_j$  representa as variáveis dependentes.

Seja  $n_i = |X_i|$  o número de valores possíveis da variável  $X_i$ , o esforço para se calcular a probabilidade conjunta global em um problema em que todas as variáveis sejam dependentes umas das

outras é da ordem  $\prod_{i=1}^n n_i$ . Por outro lado, esse esforço pode ser reduzido em função da esparcidade da relação de dependência entre tais variáveis. Essa é a principal vantagem em se conhecer exatamente qual é a relação de dependência entre as variáveis de um problema.

Teorema de Bayes<sup>[1]</sup>. Supondo  $A_1, A_2, \dots, A_n$ , partições de S e B um evento qualquer. Então, para para qualquer i, na Equação (14):

$$P(A_i \mid B) = \frac{P(A_i)P(B \mid A_i)}{P(A_1)P(B \mid A_1) + P(A_2)P(B \mid A_2) + \dots + P(A_n)P(B \mid A_n)} \quad \text{Equação (14)}$$

---

<sup>1</sup> O Teorema de Bayes foi introduzido pelo Reverendo Thomas Bayes em dois artigos em 1793 e 1794.

O Teorema de Bayes é uma regra de atualização de probabilidades sobre o espaço amostral  $\theta$ , partindo de uma distribuição a *priori*  $p(\theta)$  para a distribuição a posteriori  $p(\theta|x)$  usando a informação contida nos dados  $p(x|\theta)$  conhecida por função de verossimilhança. Toda inferência será feita com base na distribuição a *posteriori*, de onde se obtém as estatísticas necessárias para resumir o comportamento de  $\theta$ . Para descrever o comportamento de uma certa população, com determinada característica a quantidade  $\theta$  assume valores em um conjunto denotado por  $\Theta$ , conhecido por espaço paramétrico.

### 2.3.1 Rede Bayesiana

A rede Bayesiana é um modelo matemático baseado em nós e arcos que representam, respectivamente, as variáveis de um universo  $U=(A_1, A_2, \dots, A_n)$  e as dependências entre elas. A direção dos arcos, em geral, representa relações de causa-conseqüência entre as variáveis do domínio modelado. Por exemplo, se houver um arco indo de um nó A para um nó B, assume-se que o nó A representa uma causa de B e adota-se como nomenclatura que A é um dos pais de B; analogamente, B é um dos filhos de A. Associado a ele, existe uma distribuição de probabilidades.

As redes Bayesianas adotam uma representação compacta onde são definidas somente as probabilidades condicionais de cada nó em relação aos seus pais. Redes Bayesianas obedecem à condição de Markov: não existe uma relação de dependência direta entre quaisquer dois nós a não ser que exista um arco entre eles na rede.

A distribuição de probabilidade correspondente à rede é calculada a partir das probabilidades condicionais, conforme apresentado na Equação (15):

$$P(U) = P(X_1, X_2, \dots, X_n) = \prod_{i=1}^n P(X_i \mid \text{pais}(X_i)) \quad \text{Equação (15)}$$

Onde:

- $P(U)$  é a probabilidade conjunta para a rede,  $\text{pa}(X_i)$ ; são os pais do nó  $X_i$ ; e,  $P(X_i/\text{pa}(X_i))$  são as probabilidades condicionais de  $X_i$  em relação aos seus pais.

Cada nó possui um número finito, maior ou igual a dois, de categorias. As categorias, comumente denominadas estados, representam os possíveis valores da variável representada pelo nó.

Um nó é observado quando há conhecimento sobre o estado da variável que o representa. Os nós observados têm grande importância no processo de inferência realizado na rede, pois, juntamente com as probabilidades condicionais especificadas para a rede, determinam as probabilidades dos nós não observados. As probabilidades condicionais da rede após a inferência são dadas pela Equação (16).

$$P(X_i \mid E), X_i \in U \quad \text{Equação (16)}$$

Ou seja, são as probabilidades de cada nó, dado o conjunto de nós observados ( $E$ ). Em aplicações práticas, os valores da probabilidade conjunta  $P(U)$  não são muito significativos na análise do problema modelado (JENSEN, 2001).

De maior interesse são as probabilidades marginais de cada nó não observado. Utilizando-se a probabilidade conjunta, podem-se obter as probabilidades marginais somando-se, para cada estado de cada variável ( $X_i$ ), todas as probabilidades em que a variável encontra-se no estado desejado ( $x_j$ ). Em seguida,

normalizam-se as probabilidades obtidas e obtêm-se as probabilidades marginais para cada nó. A rede Bayesiana apresentada na Figura 4, mostra a relação casual direta existente entre suas variáveis ligadas por arcos orientados. Observa-se que  $x_i$  causa  $x_j$ , se houver um arco de  $x_i$  para  $x_j$ .

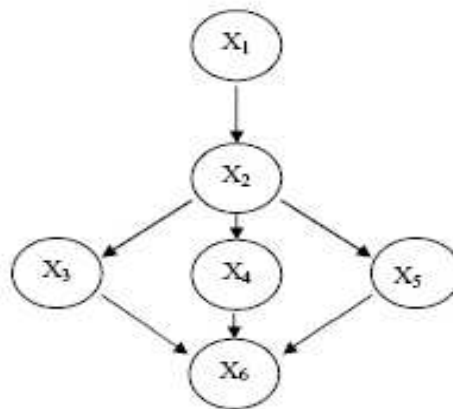


Figura 4 – Exemplo de uma rede Bayesiana

Fonte: Autor (2007).

Cada nó  $X_i$  em uma rede Bayesiana está associado a um conjunto de probabilidades tabeladas. Os nós representam uma proposta das variáveis de interesse e podem ser discretas ou contínuas. As conexões em uma rede Bayesiana asseguram a independência entre as variáveis aleatórias.

### 2.3.2 Técnicas de validação do modelo

Em todo modelo ajustado deve ser verificada, de alguma forma, sua validade. O objetivo da validação é o de verificar se ele funcionará na prática fornecendo, assim, uma proteção tanto para o modelo ajustado quanto para o usuário (DRAPER; SMITH, 1981).

Três procedimentos são úteis para verificar a validade de um modelo:

- análise dos coeficientes do modelo e dos valores preditos, pelas comparações com experimentos anteriores; e pelos resultados de simulações;
- coleta de novos dados para verificar o desempenho preditivo do modelo; e
- partição (*split*) dos dados que consiste em deixar parte dos dados originais fora da análise para investigar o desempenho preditivo do modelo com a parte não utilizada no ajuste.

### 3 OBJETIVOS

Neste tópico, estão listados os objetivos do plano de trabalho, sendo subsidiados pela investigação de parâmetros experimentais e modelos estatísticos que se aproximam da realidade e descrevem o comportamento de microrganismos em diversos meios.

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Elaboração de um plano amostral para o isolamento de bactérias.
- Isolamento e caracterização bioquímica e fisiológica de bactérias lácteas e patógenas.
- Avaliação do efeito das bacteriocinas de diferentes bactérias lácticas sobre o crescimento dos microrganismos competidores.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de um modelo estatístico que simule o comportamento vital de microrganismos patógenos.
- Teste das técnicas estatísticas de Análise de Sobrevivência com ênfase na teoria Bayesiana;
- Validação da rede Bayesiana.
- Simulação da curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos para a determinação da vida de prateleira.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho, conduzido no laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, foi utilizado um conjunto de dados referente à inibição de microrganismos patogênicos na presença de sobrenadantes, extraídos de bactérias lácticas, para a aplicação das técnicas estatísticas de análise de sobrevivência e o emprego de redes Bayesianas para inferência dos resultados.

### 4.1 MATERIAIS

Neste tópico encontram-se listados os principais materiais utilizados no trabalho, bem como as suas proveniências, de forma a facilitar as aquisições em futuras pesquisas na área em estudo.

#### 4.1.1 Microrganismos

Foram utilizadas três diferentes espécies de microrganismos procedentes da “American Type Culture Collection (ATCC)” e da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (DEBB), conforme listagem apresentada na Tabela 2.

As cepas de *Lactobacillus*, mantidas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) a -196 °C, foram ativadas em caldo MRS (DE MAN; ROGOSA e SHARP, 1960) e incubadas a 37 °C por 24 h. A cepa de *Bifidobacterium* que se apresentava liofilizada foi ativada em caldo TPY (SCARDOVI, 1986) e incubada em condições anaeróbicas a 37 °C durante 24 h.

Tabela 2 – Microrganismos utilizados no trabalho e respectivas procedências.

Microrganismo	Procedência
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	ATCC
<i>Lactobacillus sake</i> ATCC 15521	ATCC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> H-19	DEBB

Nota: DEBB, Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná; e, ATCC, "American Type Culture Collection".

#### 4.1.2 Isolamento e manutenção das cepas isoladas

As cepas foram semeadas em placas de Petri, contendo ágar MRS com 0,3% de uma solução de azul de anilina a 4%. As cepas de bactérias lácticas têm a propriedade de assimilar o azul de anilina do meio facilitando o reconhecimento das características morfológicas das colônias (GIRAUD, 1992). As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 48 h. Colônias azuis isoladas foram repicadas em caldo MRS estéril e incubadas a 37 °C por 24 h para posterior estudo de suas características.

As cepas utilizadas com maior frequência foram repicadas e mantidas a 4 °C em tubos contendo ágar MRS.

Para a manutenção em longo prazo, as cepas foram cultivadas em caldo MRS a 37 °C durante 24 h. As culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos. A biomassa foi adicionada em 10% de glicerol, sendo transferida para microtubos estéreis e conservada em N<sub>2</sub> líquido à temperatura de -196 °C.



#### 4.1.3 Seleção das cepas

A seleção das cepas isoladas foi realizada com base nas características morfológicas microscópicas, na coloração de Gram, na atividade de catálase, na produção de CO<sub>2</sub> a partir da glicose, no perfil de produção de ácidos orgânicos e etanol por HPLC e na viabilidade das cepas a sucessivas repicagens. As cepas que se mantiveram viáveis foram testadas quanto à sua capacidade de inibir microrganismos patogênicos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

#### 4.1.4 Atividade inibitória frente a microrganismos patogênicos

As cepas utilizadas no teste foram cultivadas em caldo MRS durante 48 h e centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi dividido em duas porções. Uma, denominada tal qual (TQ), sendo esterilizada em membrana de éster de celulose de 0,22 µm de poro e recolhida em microtubo estéril. Outra porção, denominada neutralizada (N), foi ajustada a pH 6,0, com NaOH 1 N e, posteriormente, filtrada em membrana de éster de celulose de 0,22 µm e recolhida em microtubo estéril.

A atividade inibitória frente aos microrganismos patogênicos foi determinada, inicialmente, em microtubos de 1,5 mL, por densidade ótica a 660 nm (DO<sub>660</sub>), em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC. Os sobrenadantes foram adicionados em igual volume de caldo Mueller-Hinton (MH). Após, foram inoculados com 2% (v/v) dos microrganismos patogênicos previamente reativados em caldo MH e incubados a 37 °C durante a noite. Foi utilizado como controle (C) o caldo MH com igual volume de caldo MRS adicionados de 2% da cultura do microrganismo patogênico. Os testes foram realizados na temperatura de 37 °C.

Posteriormente, o teste de inibição de microrganismos patogênicos foi realizado em microplacas de Elisa e a leitura realizada em 660 nm em equipamento marca BioTek, modelo “Power Wave XS” e o programa KC Junior. Os sobrenadantes foram adicionados em igual volume de caldo Mueller-Hinton (MH) e inoculados com 10% (v/v) dos microrganismos patogênicos previamente reativados em caldo MH, incubados a 37 °C, durante a noite e diluídos a 1:10 com água destilada estéril.

Foi utilizado como branco o caldo MH misturado em igual volume de caldo MRS e como controle, o caldo MH com igual volume de caldo MRS adicionados de 10% da cultura do microrganismo patogênico. A temperatura de incubação dos testes foi, também, de 37° C. Na Tabela 3, estão listados os microrganismos patogênicos utilizados neste teste.

Tabela 3 – Cepas-referência utilizadas nos testes de inibição de microrganismos patogênicos.

Microrganismo	Procedência
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	ATCC
<i>E. coli</i> ATCC 25922	ATCC
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ATCC

Nota. ATCC: “American Type Culture Collection”.

#### 4.1.5 Concentração inibitória mínima

Os cálculos de porcentagem de inibição foram efetuados pela Equação (17).

$$I(\%) = \left( \frac{\text{Inc. DO controle} - \text{Inc. DO amostra}}{\text{Inc. DO controle}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (17)}$$

Onde:

$I(\%)$  = porcentagem de inibição da amostra em relação ao controle;

*Inc. DO controle* = incremento da densidade ótica do controle;

*Inc. DO amostra* = incremento da densidade ótica da amostra.

## 4.2 MÉTODOS

A metodologia empregada nesta pesquisa encontra-se apresentada em tópicos cronológicos de sua execução.

### 4.2.1 Planejamento Experimental

Neste trabalho foi avaliado o efeito de cinco variáveis (sobrenadante, *Lactobacillus*, temperatura, pH e atividade de água ( $A_w$ )) na análise do tempo de vida dos microrganismos *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. aureus*. Para um delineamento fatorial completo com cinco variáveis em dois graus, geraria uma matriz de 46 ensaios ( $2^5 = 32 + 4 \text{ pc} + 10 \text{ axiais} = 46 \text{ ensaios}$ ). Optou-se, então, por explorar as variáveis num planejamento  $2^{5-1}$  (16 ensaios + 4 pc), com vinte ensaios iniciais. Segundo Rodrigues e Lemma (2005), esta estratégia permite avaliar os efeitos das variáveis principais com a mesma segurança em relação a um planejamento completo com 32 ensaios.

Após a análise dos efeitos, foi realizado um Delineamento Completamente Casualizado Reduzido (DCCR) para as cinco variáveis. Na Tabela 4, encontram-se apresentados os graus e os valores originais correspondentes utilizados no planejamento  $2^{5-1}$  sendo que, na Tabela 5, estão apresentados os resultados de

crescimento com 9 e 24 h, para os 19 ensaios. As absorvâncias apresentadas (entre 0,085 a 0,533 nm) indicam um não-crescimento nos valores inferiores de temperatura (8° C), pH (5,0) e Aw (0,802).

Na Tabela 6, os resultados do efeito dos fatores sobre o crescimento dos microrganismos patógenos, indicam que a temperatura, o pH e a Aw são estatisticamente significativos à 5% de e a 8% de significância respectivamente. Os resultados mostram, ainda, que o crescimento foi afetado pela temperatura (p= 0,0001), precipitado (p= 0,01), e pela atividade de água (p= 0,08) com uma boa significância. Um incremento na temperatura, no precipitado e na atividade de água, (nível: de -1 para +1) resultou em um acréscimo na cinética de crescimento. Já, um incremento nas concentrações do sobrenadante e do precipitado (de 30 para 90 µL), resultou em decréscimo nos valores de absorvância para os microrganismos patógenos.

Tabela 4 - Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado de cinco variáveis e três níveis.

Incremento	-1	0	+1
Sobrenadante (µL)	30	60	90
Precipitado (µL)	30	60	90
Temperatura (° C)	8	15	37
pH	5,0	6,0	7,0
Atividade de água (Aw)	0,80	0,86	0,96

Tabela 5 – Delineamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  para o crescimento de microrganismos patógenos após 9 e 24 h de acompanhamento de cinco variáveis e três níveis.

Ensaio	Sobrenadante	Precipitado	Temperatura	pH	Aw	Cresc.	
						9 h	24 h
1	-1	-1	-1	-1	+1	0,194	0,194
2	+1	-1	-1	-1	-1	0,131	0,131
3	-1	+1	-1	-1	-1	0,085	0,085
4	+1	+1	-1	-1	+1	0,155	0,155
5	-1	-1	+1	-1	-1	0,455	0,522
6	+1	-1	+1	-1	+1	0,509	0,529
7	-1	+1	+1	-1	+1	0,459	0,516
8	+1	+1	+1	-1	-1	0,286	0,492
9	-1	-1	-1	+1	-1	0,129	0,129
10	+1	-1	-1	+1	+1	0,224	0,224
11	-1	+1	-1	+1	+1	0,175	0,355
12	+1	+1	-1	+1	-1	0,145	0,145
13	-1	-1	+1	+1	+1	0,510	0,533
14	+1	-1	+1	+1	-1	0,506	0,514
15	-1	+1	+1	+1	-1	0,111	0,162
16	+1	+1	+1	+1	+1	0,261	0,370
17	0	0	0	0	0	0,195	0,424
18	0	0	0	0	0	0,191	0,334
19	0	0	0	0	0	0,221	0,363
20	0	0	0	0	0	0,186	0,232

Tabela 6 – Estimativa dos efeitos para o crescimento dos patógenos.

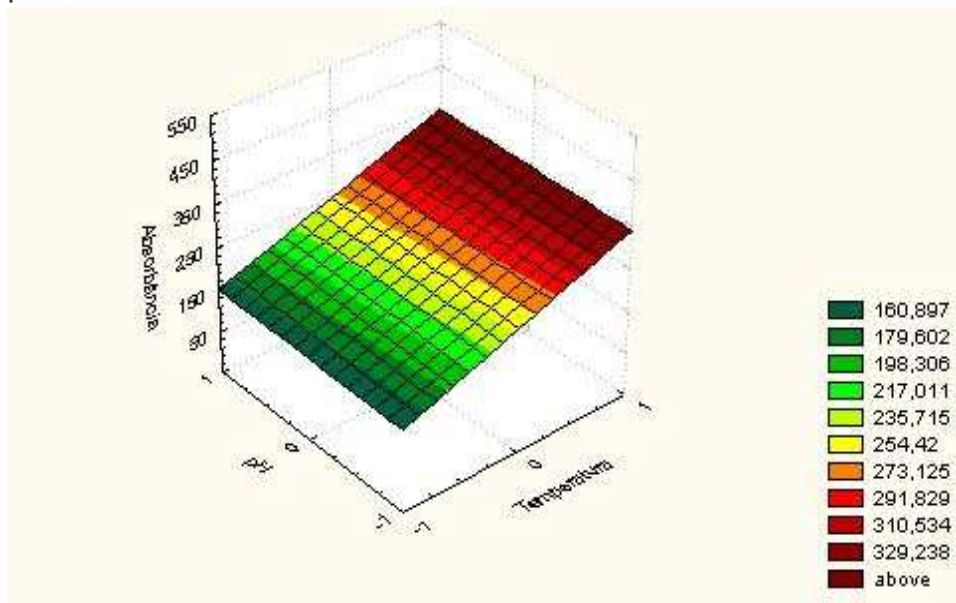
	Gl	Q. Médio	F valor	Pr (>F)
Sobrenadante (µL)	1	613	0,0861	0,7738
Precipitado (µL)	1	60148	8,4556	0,0122*
Temperatura (°C)	1	215993	30,3644	0,0001***
pH	1	2836	0,3986	0,0554**
Aw	1	25520	3,5876	0,0807****
Resíduos	14	7113		

Nota. 0 '\*\*\*\*'; 0,001 '\*\*\*'; 0,01 '\*\*'; 0,05 '\*\*\*\*'; 0,1 ' ' 1

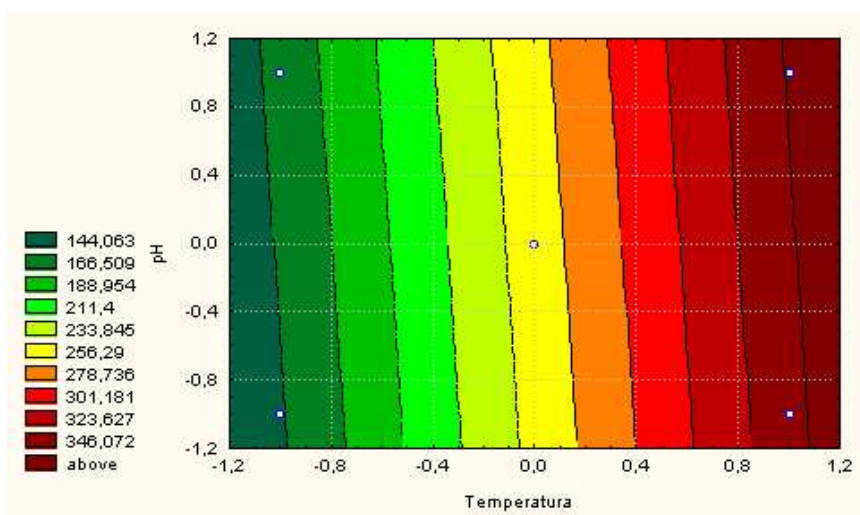
Pela análise da superfície de respostas, Figuras 5 (a) e (b), verifica-se que os valores de absorvância são proporcionais à temperatura de trabalho, isto é, os valores de absorvância são mais altos para temperaturas de 15 a 37 °C. O pH influenciou diretamente na cinética de crescimento, para o pH 6,0 foi observada uma elevação da absorvância, culminando com o pH 8,0, que é o ápice dos resultados observados. Hurst (1983), observou que a adsorção da nisina sobre células sensíveis é dependente do pH, com um máximo em pH 6,5. Pelas Figuras 5 (c) e (d), foi observado que, além da temperatura e o pH, a atividade de água (Aw) contribuiu favoravelmente para o incremento dos valores de absorvância. Para a atividade de água acima de 0,865 a absorvância se aproximou de 250 nm, o que correspondeu à, aproximadamente, metade dos valores finais observados.

Para o precipitado, nas Figuras 6 (a) e (b), podem ser observadas alteração no pH e, conseqüentemente, redução na

absorbância em função da inibição dos microrganismos. Tal fato já não se observa quando da aplicação do sobrenadante (Figuras 6 (c) e (d)), que promoveu uma pequena elevação no pH, mantendo estáveis os índices de absorbância.

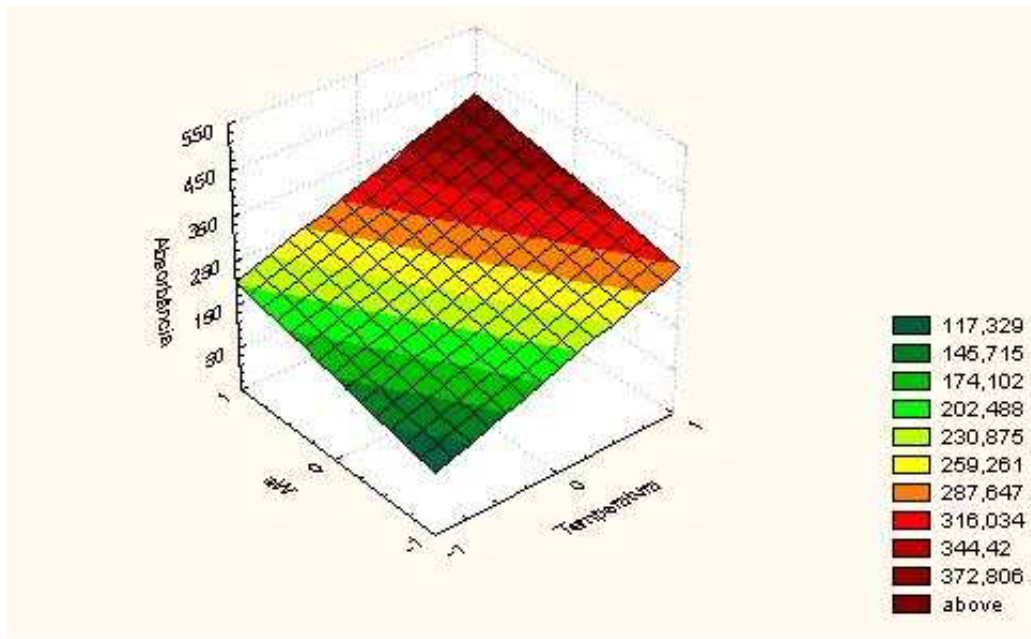


(a)

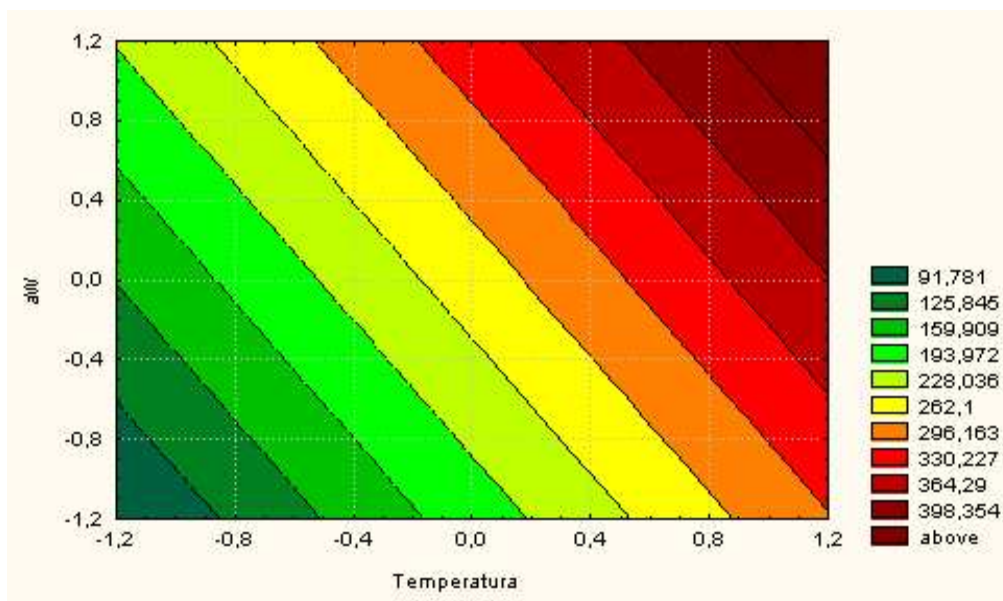


(b)

Figura 5 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patógenos em estudo, medidos pela absorbância: (a) e (b) temperatura e pH.



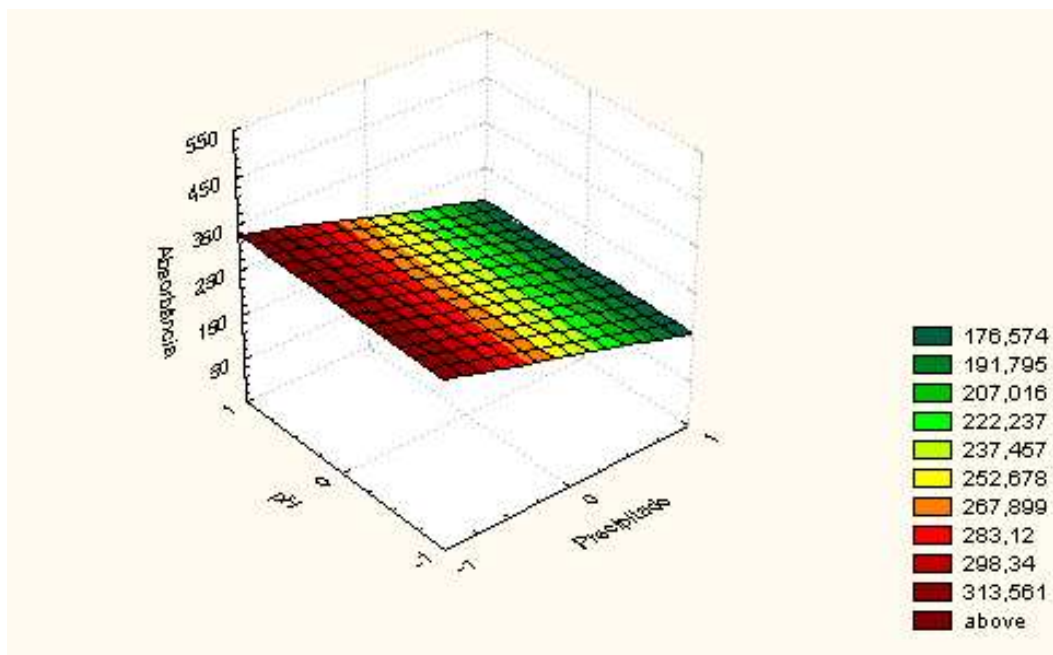
(c)



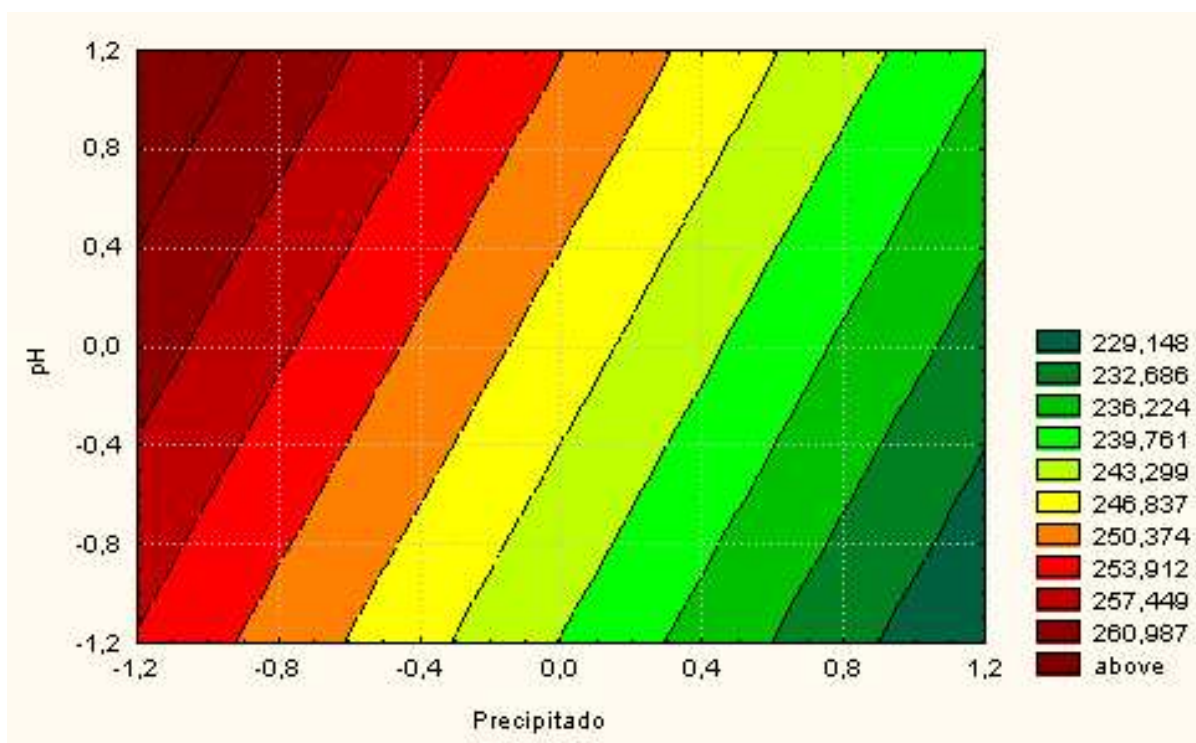
(d)

Figura 6 – Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patógenos em estudo, medidos pela absorbância: (c) e (d) temperatura e  $A_w$ .



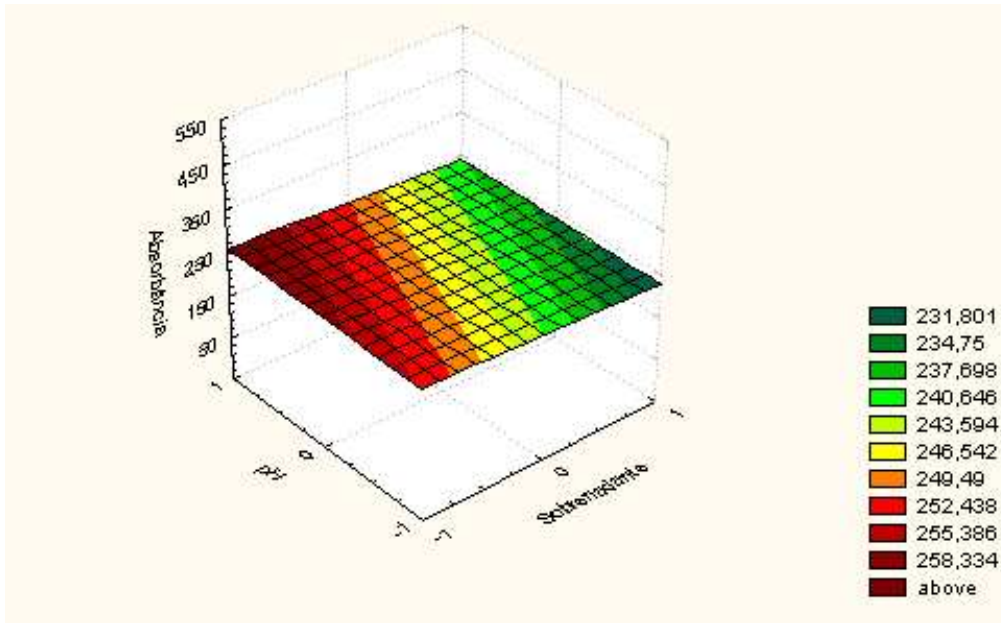


(a)

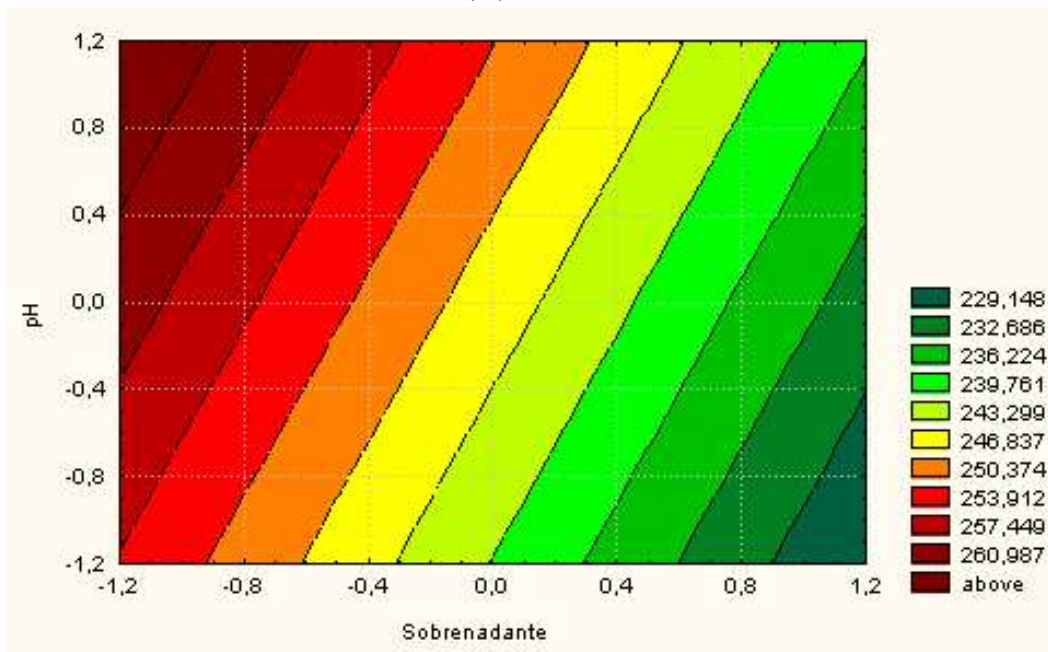


(b)

Figura 7 - Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patogênicos em estudo, medidos pela absorvância: (a) e (b) da variável pH e do precipitado.



(c)



(d)

Figura 8 - Superfície de resposta e curvas de contorno para a cinética de crescimento dos microrganismos patógenos em estudo, medidos pela absorbância: (c) e (d) do pH e do sobrenadante.

#### 4.2.2 Análise Univariada

Para estudar o antagonismo das variáveis sobre a concentração inibitória mínima dos microrganismos patógenos, foram determinadas as taxas de sobrevivência global após 24 h.

O tempo de sobrevivência é uma variável dependente de interesse e é definida como o tempo transcorrido entre o início da observação até que o evento ocorra. Para efeito deste trabalho a hora de início do tratamento foi considerada como a hora de incubação dos três microrganismos com o sobrenadante da respectiva bactéria láctica, aqui denominado tempo zero. Foi considerado como evento ou falha, a ocorrência da concentração inibitória mínima, CIM. Os dados foram considerados censurados quando completadas as 24 h após o início do estudo.

A escolha do tempo de sobrevivência em 24 h foi baseada em uma maior relação entre esse tempo de sobrevivência e o ciclo de vida de cada microrganismo em condições ideais de cultura. Considerando que as bactérias crescem segundo uma progressão geométrica, em que o número de indivíduos se duplica após um tempo determinado denominado tempo de geração ( $\mu$ ), calculou-se o número de bactérias  $N$  ao término de um número de gerações ( $n$ ), usando a Equação (18).

$$N = N_0 2^n \quad \text{Equação (18)}$$

Sendo,  $N_0$  o número de células no momento atual. O número de gerações  $n$  se pode calcular da seguinte forma (Equação (19)):

$$n = t/\mu \quad \text{Equação (19)}$$

Onde,  $t$  é o tempo transcorrido.

Os tempos de geração de bactérias crescendo em ambientes favoráveis podem ser muito curtos (valores de  $\mu$  de 20 minutos).

Isto significa que uma única célula ( $N_0 = 1$ ) crescendo com  $\mu = 20$  minutos pode produzir  $4,7 \times 10^{21}$  células em 24 h (FREEMAN, 1986).

O processo de utilização do sobrenadante (neutralizado e TQ) foi estudado como variável independente ou exploratória. Em uma avaliação exploratória inicial foram confeccionadas curvas de sobrevivência para cada variável independente. O método utilizado foi o estimador produto limite de Kaplan-Meier (KAPLAN; MEIER, 1958).

Foi aplicado o teste de “log-rank” para fazer uma comparação entre as curvas obtidas para as categorias diferentes da mesma variável, ou seja, avaliou-se a existência ou não de alguma diferença estatística entre as distribuições das curvas obtidas.

#### 4.2.3 Análise univariada de Cox

Após a análise inicial, as variáveis que apresentaram significância estatística pelo teste de “log-rank” ou foram consideradas de importância, foram submetidas à análise univariada de Cox. Nessa análise, elas foram comparadas individualmente e, em suas categorias, em relação ao desfecho, a concentração inibitória mínima (CIM), sendo, o tempo, a variável dependente. A significância estatística, foi avaliada pelo método de Cox (Mantel, 1966; Cox, 1972), baseada em intervalos de confiança de 95%. De acordo com suas significâncias estatísticas ou importância físico-química, as variáveis foram aplicadas no modelo regressão de riscos proporcionais de Cox.

Na análise univariada de Cox, não foram avaliadas aquelas variáveis que em suas categorias foram únicas para ambos os tratamentos, tal como, a temperatura, que se manteve constante em 37 °C. Esta variável foi estudada, somente, na análise

univariada de Kaplan-Meier. Seu estudo foi mantido nessa primeira análise porque é considerado importante fator prognóstico, sendo relacionado à sobrevida final e, os resultados obtidos, podem servir de base para estudos específicos desses aspectos no futuro.

#### 4.2.1 Análise multivariada

Foi escolhida a técnica de regressão de Cox (Cox,1972) por ser esse um modelo apto a estimar curvas de sobrevida quando são estudadas muitas variáveis simultaneamente, podendo-se prever, separadamente, os riscos de sobrevida em função das diferentes variáveis estudadas. Essa técnica é, também, conhecida como modelo de riscos proporcionais, regressão de Cox ou modelo de Cox. Este é um modelo muito útil em estudo de fatores prognósticos, pois por seu intermédio pode-se avaliar o efeito conjunto das variáveis independentes na sobrevida de um indivíduo.

Para o uso do modelo de Cox convencional, foi necessário verificar se os pressupostos do mesmo estavam sendo seguidos. O principal deles consiste em assumir que os riscos para uma variável independente sejam constantemente proporcionais ao tempo (proporcionalidade de "Hazard Ratios" ao longo do tempo). Para efetuar essa avaliação, foram confeccionados gráficos de resíduos de Schoenfeld das variáveis com significância estatística (Figura 9).

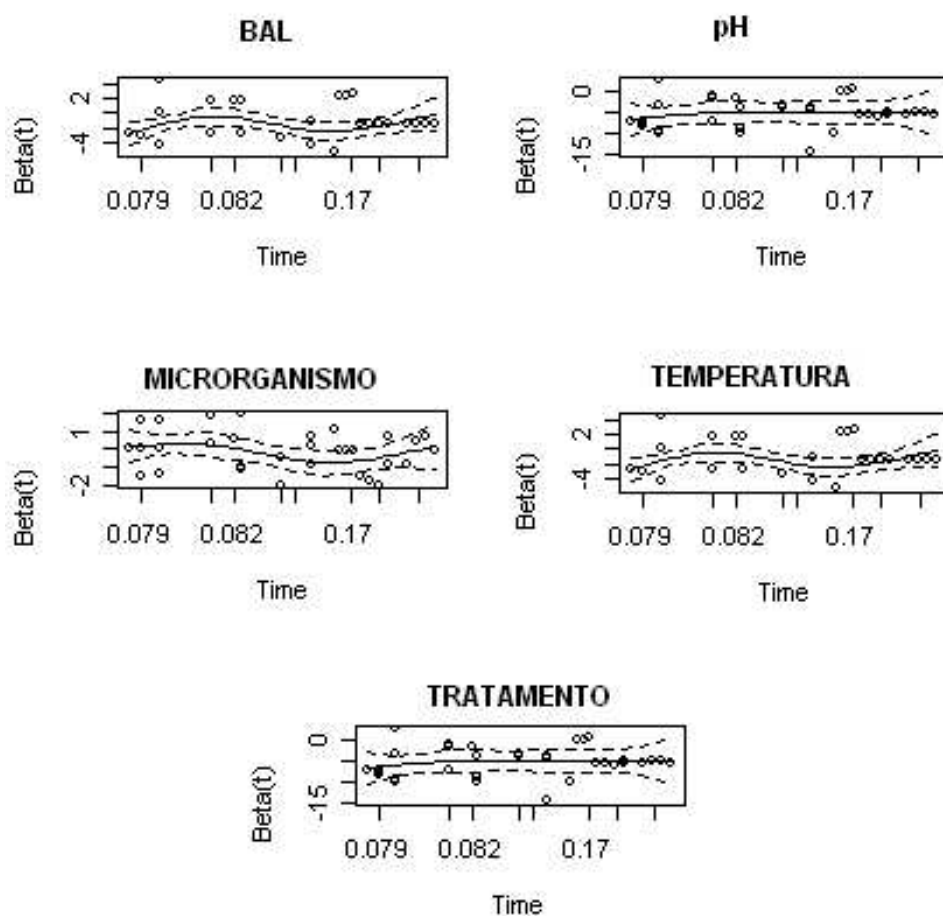


Figura 9 – Resíduos de Schoenfeld para validação do modelo DE Cox Convencional para as variáveis BAL, Ph, Microrganismos patógenos, temperatura e tratamento.

A maneira pela qual o sobrenadante foi obtido foi estudada como variável independente no modelo. Foram realizados modelos separados para os dois tratamentos em estudo. Ambos para se avaliar os possíveis vieses decorrentes das diferenças operacionais, bem como para validar o modelo que englobava os dois tratamentos. Para a confecção da análise múltipla utilizou-se a técnica de regressão de Cox com a inclusão de cada variável seqüencial e isoladamente (método enter). Para determinar a ordem de entrada no modelo de regressão, seguiu-se a significância estatística obtida na análise univariada de Cox.



Entraram no modelo todas as variáveis que contemplavam o estudo, se fossem estatisticamente significativas considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$  e algumas variáveis de importância. A retirada das mesmas foi realizada quando estas perdiam a significância estatística, com base na razão de verossimilhança (“likelihood ratio”).

O registro dos dados coletados foi armazenado em um banco de dados específico, utilizando-se o programa Excell®. Na realização das análises univariada pela técnica de Kaplan-Meier e pelo método de Cox foi utilizado o programa R versão 2.5.1.

#### 4.3 Análise de sobrevivência

No banco de dados Antagonismo (Anexo A) estão registradas amostras dos três microrganismos patogênicos. A primeira hora do estudo foi chamada de tempo zero, e o tempo de estudo início e final de cada microrganismo foi contado como o valor da absorbância a 660 nm a partir da incubação, até que o valor da absorbância atingisse um valor aqui definido como concentração inibitória mínima (Equação 17). Quando este valor não foi atingido no intervalo de tempo analisado, o microrganismo foi considerado como censurado.

##### 4.3.1 Sobrevivência utilizando o sobrenadante neutralizado

O microrganismo *E.coli* e *S.aureus* utilizando os sobrenadantes do *L.acidophilus*, *L.rhamnosus* e o *L.sake* (Figuras 10, 11 e 12) acompanhados a partir do tempo zero, saíram do estudo com os valores de 0,314 e 0,323 de absorbância quando atingiram 6 h de sobrevivência. Já, o microrganismo *L.monocytogenes* utilizando os sobrenadantes *L.rhamnosus* e *L.sake* (Figuras 11 e 12) entrou no estudo no tempo zero e foi censurado (*status*= 0) após 24 h de observação com um valor de absorbância de 0,784 sem a

ocorrência de inibição. Já, Schilliner, Lúcke (1989) relataram que *L. monocytogenes* foi inibida por até uma semana em carne picada, na presença de *Lactobacillus sake* Lb 706 produtor de sakacina A. Neste trabalho a redução de uma unidade logarítmica foi observada quando da utilização do *Lactobacillus acidhophilus* ao término de 6 h (Figura 10).

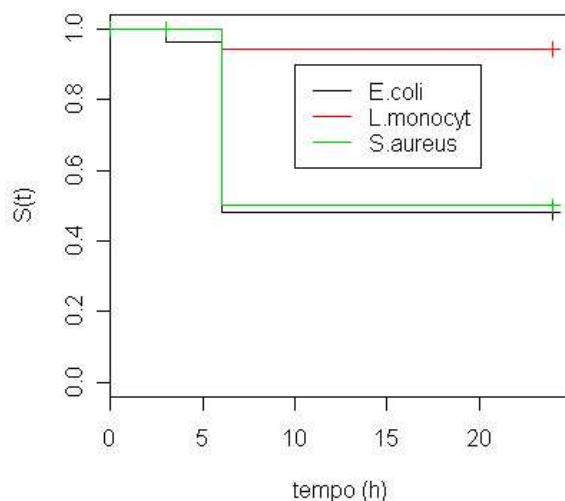


Figura 10 – Curva de sobrevivência dos microrganismos patogênicos com a utilização do sobrenadante *L.acidhophilus*.

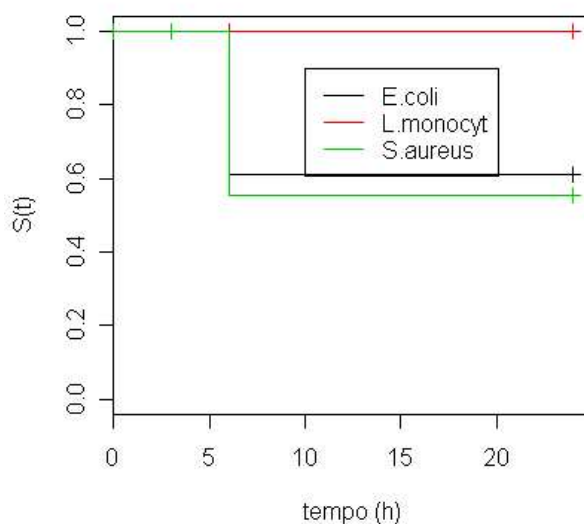


Figura 11 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patogênicos com a utilização do sobrenadante *L.rhamnosus*.



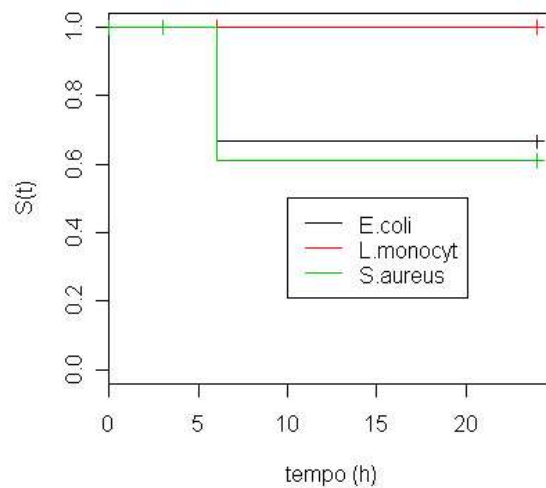


Figura 12 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante *L.sake*.

#### 4.3.2 Sobrevivência utilizando o sobrenadante Tal Qual

A utilização do sobrenadante *L.acidophilus* não foi significativo para a inibição de *L. monocytogenes* (Figura 13). Significante efeito inibitório pode ser observado com a utilização dos sobrenadantes TQ, utilizando os *Lactobacillus rhamnosus e sake* (Figuras 13 e 14). De acordo com Mataragas et al (2003), o controle das condições ambientais parece desempenhar uma importante função na produção de bacteriocina. Resultados de seus estudos com as bacteriocinas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus curvatus* mostraram que a sua produção foi afetada pela manipulação dos valores de pH e da temperatura. As condições ótimas de produção das bacteriocinas não coincidiram com as do crescimento bacteriano. Os valores de pH e temperatura para o crescimento foram de 5,5 a 6,0, a 30°C e de pH 5,5 a 25°C.

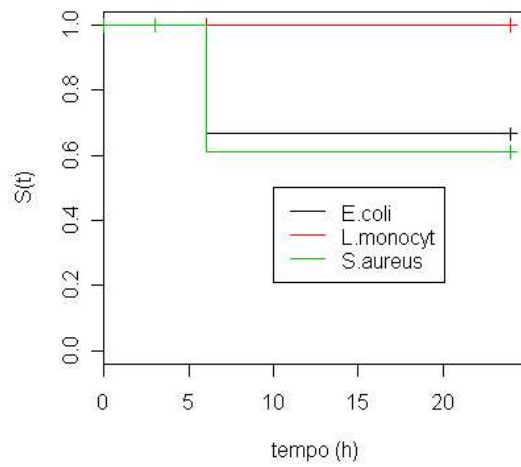


Figura 13 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante *L.acidophilus*.

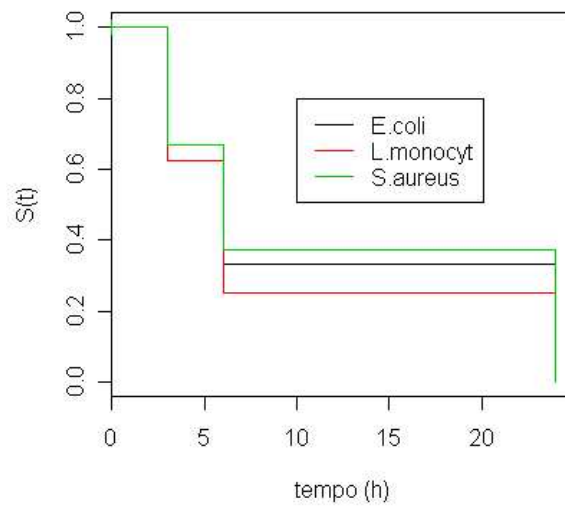


Figura 14 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante *L.rhamnosus*.

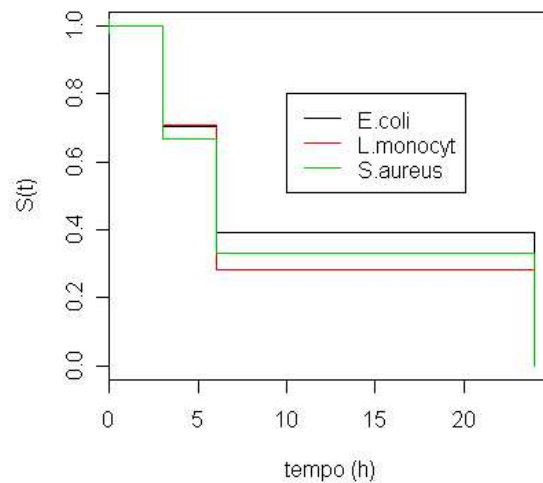


Figura 15 - Curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos com a utilização do sobrenadante *L.sake*.

#### 4.4 Uso da rede Bayesiana

Com base no Teorema de Bayes (Equação 14) foi testada a hipótese ( $H_i$ ) de ocorrer a falha dos microrganismos patógenos dada a ocorrência do antagonismo da bacteriocida extraído dos respectivos lactobacilos. O uso deste teorema, segundo a literatura, é matematicamente perfeito e somente uma má avaliação dos  $P(H_i)$  é que pode tornar sua aplicação discutível (MEYER, 1975).

Após a decisão das variáveis essenciais à tomada de decisão, o modelo será implementado na técnica de Rede Bayesiana, por intermédio do Shell NETICA<sup>®</sup>, da Norsys ([www.norsys.com](http://www.norsys.com)). A modelagem da rede é realizada em duas fases distintas. Na primeira, serão identificadas as variáveis essenciais ao processo de tomada de decisão, para quantificar a probabilidade de sobrevivência dos microrganismos patógenos diante da bacteriocina, fase esta já avaliada no item anterior (Análise de Sobrevivência), para criar a rede semântica. Após, os

valores de probabilidade condicional e a *priori* serão inseridos na rede.

#### 4.4.1 Construção da Rede Bayesiana

A construção de uma Rede Bayesiana exige que certos cuidados sejam tomados de modo a permitir que a tabela de conjunção de probabilidades resultante seja uma boa representação do problema. Tomando como base a Equação 13, tem-se que:

$$P(x_1 \dots x_n) = \prod P(x_i \setminus Pais(x_i)) \quad \text{para } 0 \leq i \leq n,$$
 esta pode ser reescrita como:

$$P(x_1 \dots x_n) = P(x_n \setminus x_{n-1} \dots x_1) P(x_{n-1}, \dots, x_1)$$

Repete-se este processo até se obter uma conjunção menor, reduzindo cada conjunção de probabilidade em uma probabilidade condicional.

$$P(x_1 \dots x_n) = P(x_n \setminus x_{n-1} \dots x_1) P(x_{n-2}, \dots, x_1) \dots P(x_2 \setminus x_1) P(x_1) = \prod P(x_i \setminus X_{i-1} \dots x_1)$$

para  $0 \leq i \leq n$

Equação (20)

Comparando esta equação com a Equação 13, observa-se que a especificação de uma tabela de conjunção de probabilidades, é equivalente à equação geral:

$$P(X_i \setminus X_{i-1}, \dots, X_1) = P(X_i \setminus Pais(X_i)) \quad \text{para } Pais(X_i) \subseteq \{x_{i-1} \dots x_1\} \quad \text{Equação (21)}$$

Esta equação expressa que a rede Bayesiana é a representação correta de um domínio, se e somente se, cada nó é condicionalmente independente de seus predecessores, dado seu pai.

Um escopo do modelo foi construído para pré-selecionar as variáveis que fariam parte dos nós da rede utilizando-se como fonte os resultados obtidos na Análise de Sobrevivência apresentados na Figura 16.

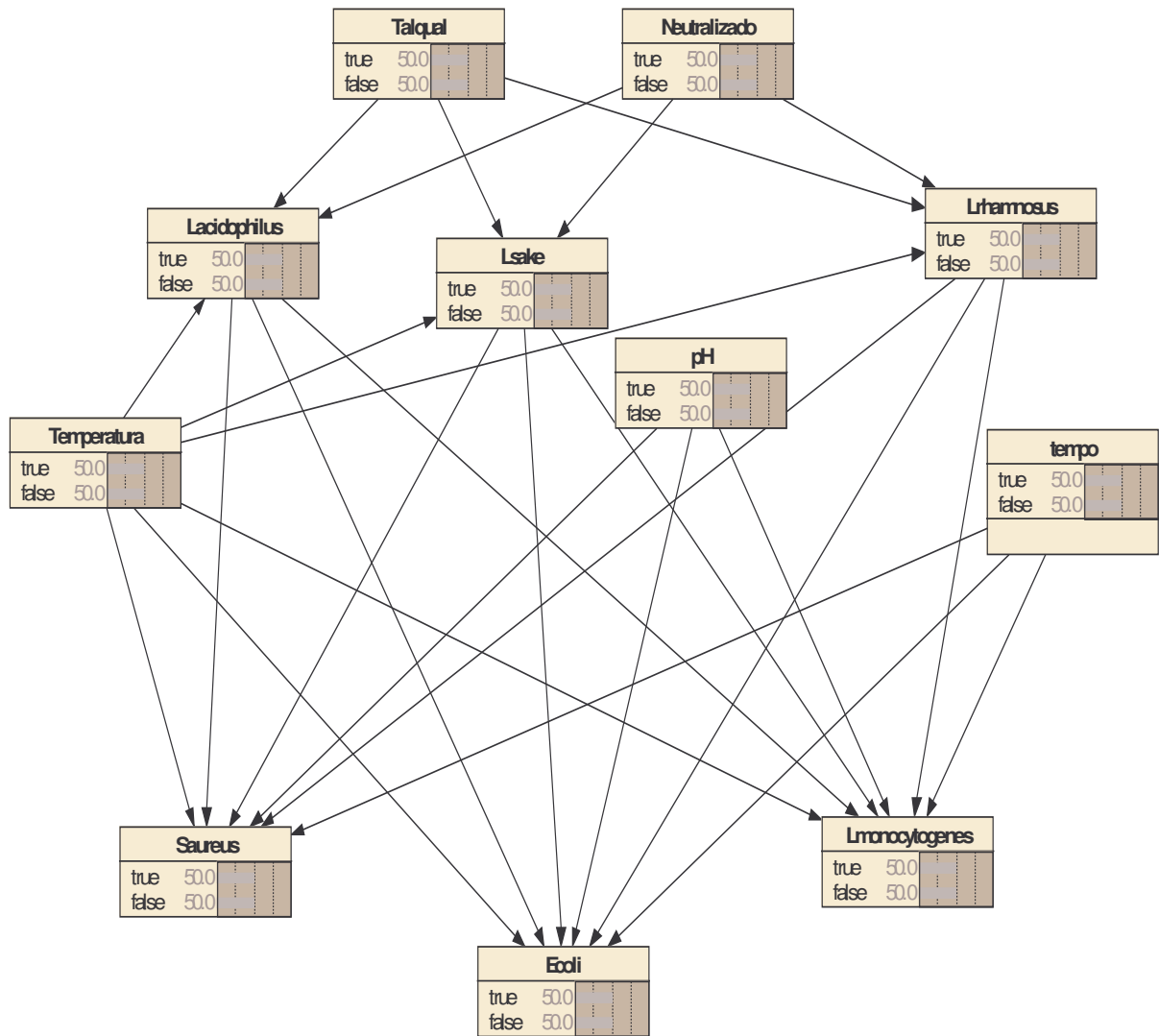


Figura 16 – Modelo da rede, construído para pré-selecionar as variáveis Sobrenadantes, Temperatura, pH, Aw, Tempo e microrganismos Patógenos.

A presente rede Bayesiana é um modelo gráfico que tem como estrutura um grafo direcionado acíclico. Os nós e arcos do modelo representam, respectivamente, as variáveis do universo  $U = (A_1, A_2, \dots, A_n)$  e as dependências entre estas. Na rede

construída para o problema do antagonismo aqui modelado, a direção dos arcos representa relações de causa-conseqüência entre as variáveis.

Associado ao gráfico, existe uma representação de probabilidades. As redes Bayesianas adotam uma representação compacta onde são definidas somente as probabilidades condicionais de cada nó em relação aos seus pais. Para a aplicação das redes Bayesianas é necessário que se obedeça a condição de Markov, apresentada na Equação (13).

Em aplicações práticas, os valores da probabilidade conjunta não são muito significativos na análise do problema modelado. De maior interesse são as probabilidades posteriores de cada nó não observado. Utilizando-se a probabilidade conjunta, podem-se obter as probabilidades posteriores somando-se, para cada estado de cada variável, todas as probabilidades em que a variável encontra-se no estado desejado. Em seguida, normalizam-se as probabilidades obtidas e obtêm-se as probabilidades posteriores para cada nó.

#### 4.4.2 O aprendizado em redes Bayesianas

O aprendizado em redes Bayesianas (HECKERMAN; GEIGER; CHICKERING, 1995) pode ter como objetivo a obtenção das probabilidades da rede, da estrutura da rede, ou ambos. Os objetos utilizados no aprendizado são um algoritmo de aprendizado e uma base de dados, esta correspondente ao domínio do problema modelado pela rede. A estrutura inicial da rede pode ser obtida a partir das probabilidades definidas por técnicas estatísticas que possibilitam a obtenção de probabilidades a priori, e podem ser usadas como ponto de partida para algoritmos de aprendizado. Ou, então, pode-se obter as probabilidades por aprendizado, que seriam posteriormente

verificadas por especialistas. De qualquer forma, o objetivo final é obter as probabilidades que melhor correspondam à realidade do problema modelado pela rede Bayesiana.

#### 4.4.3 Limitações na estrutura da rede

Alguns fatores não puderam ser inseridos na estrutura da rede em função de dificuldades no levantamento dos dados:

- O excessivo número de probabilidades necessárias para a quantificação da rede (HECKERMAN; BREESE, 1994). Em um nó  $X$ , com  $k$  categorias, o número de probabilidades a serem especificadas é dado pela Equação 22:

$$n^{\circ} \text{ de elementos da tabela}(x) = K^{\prod_{pa(x)} n \text{ categorias } pa(x)} \quad \text{Equação (22)}$$

Na maioria dos casos, cada variável aleatória é diretamente influenciada por no máximo  $k$  outras variáveis. Suponha-se, por questões de simplicidade, que as variáveis aleatórias possam assumir apenas valores booleanos, neste caso, a quantidade de informação necessária para se especificar uma determinada tabela de probabilidades condicionais será no máximo  $2k$  números, em contraste com uma tabela de conjunção de probabilidades,  $2n$ . Apenas como um exemplo do poder de compactação, suponha-se uma rede com 20 nós ( $n = 20$ ), cada nó com no máximo 5 pais ( $k = 5$ ), uma rede Bayesiana necessitaria de 640 números, enquanto uma tabela “join<sup>2</sup>” (rotina de classificação, cuja operação cria um novo elemento em um novo banco de dados para cada elemento da tabela principal) que classifica mais de 1 milhão.

---

<sup>2</sup> <http://dev.mysql.com/doc/refman/4.1/pt/join.html>, acessado em novembro de 2007.

Entretanto, existem domínios que requerem que cada nó seja influenciado por todos os outros. Nestes casos, a especificação de uma tabela de conjunção de probabilidades requer a mesma quantidade de informação que uma rede Bayesiana. Porém, na prática, a maioria dos problemas podem ser simplificados de forma a se garantir que a rede não seja conexa, sem perda de informação útil.

#### 4.4.4 Obtenção de probabilidades

Para a quantificação da rede Bayesiana apresentada neste trabalho foi utilizada a quantificação de probabilidade a partir do estudo da Análise de Sobrevivência. Tal método possibilitou a obtenção das probabilidades de uma maneira rápida, seguida de correções nos valores de alguns resultados que se mostraram incoerentes durante as avaliações efetuadas.

#### 4.4.5 Probabilidades marginais

As probabilidades marginais correspondem aos nós sem pais, e são de fácil obtenção. Graficamente, são apresentadas na parte superior da rede.

Nas Tabelas 7 a 10, estão representadas as probabilidades marginais da rede. A primeira linha de cada tabela representa as categorias do nó, e, a segunda, o teor de cada categoria.

Tabela 7- Temperatura (°C)

<b>5-15</b>	<b>30-45</b>	<b>35-47</b>
5%	70%	15%



Tabela 8 - Tempo (horas)

<b>&lt;3</b>	<b>6</b>	<b>&gt;24</b>
26%	55%	19%

Tabela 9 – pH

<b>0,1 - 5,4</b>	<b>5,4 - 8,5</b>	<b>8,5 - 11,5</b>
18%	80%	2%

Tabela 10 – Aw

<b>&lt;0,8</b>	<b>0,8-0,9</b>	<b>&gt;0,9</b>
0,2%	18%	81,8%

#### 4.4.6 Probabilidades Condicionais

Os demais nós da rede têm probabilidades condicionais em relação aos respectivos pais. A título de exemplo, na Figura 17, os nós foram divididos em dois grupos: o dos lactobacilos aqui representado pelo nó do sobrenadante do *L. sake* e o dos microrganismos patógenos (*E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*). O grupo dos lactobacilos tem a sua probabilidade de sobrevivência dependente somente das condições ambientais (temperatura, pH, Aw etc.), somente especificada na rede completa, em capítulo posterior. No segundo grupo, a dos microrganismos patógenos, os nós representam a probabilidade de sobrevivência dadas as condições específicas que lhe são atribuídas na rede.

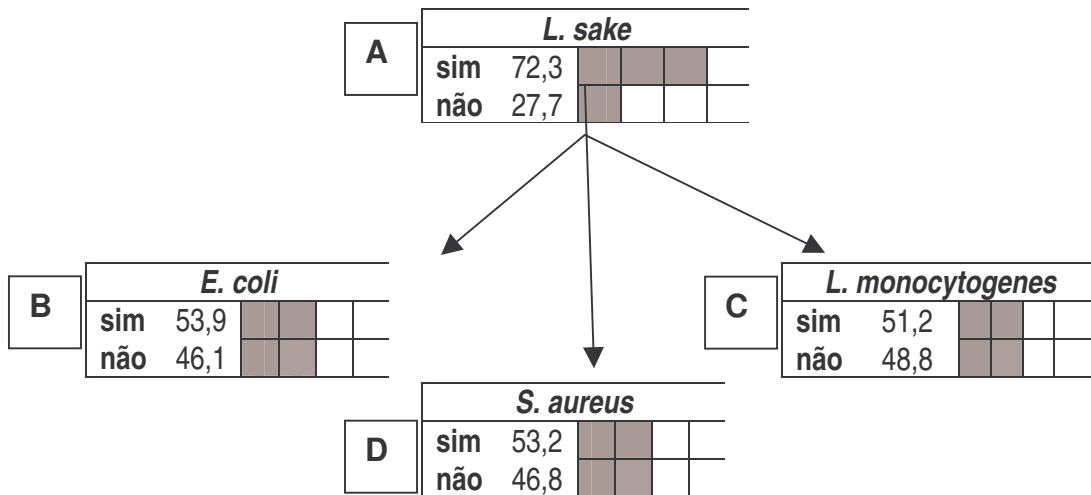


Figura 17 – Rede Bayesiana com quatro nós (pintura gráfica aproximada, por falta de resolução).

Nas Tabelas 11 e 12, encontram-se listadas as probabilidades condicionais de apenas um nó da rede a título de exemplo do cálculo das probabilidades, sendo, na primeira coluna de cada tabela, consideradas as possíveis combinações de pais e, na primeira linha as categorias do nó. Em cada linha subsequente estão consideradas as probabilidades condicionais para cada combinação de pais.

Tabela 11 - Valores de  $P(A)$ .

$P(a_1)=0,72$	$P(a_2)=0,28$
---------------	---------------

Tabela 12 – Valores das probabilidades condicionais.

$P(b_1 a_1)=0,80$	$P(b_2 a_1)=0,20$
$P(b_1 a_2)=0,29$	$P(b_2 a_2)=0,71$
$P(c_1 a_1)=0,74$	$P(c_2 a_1)=0,26$
$P(c_1 a_2)=0,28$	$P(c_2 a_2)=0,72$
$P(d_1 a_1)=0,78$	$P(d_2 a_1)=0,20$
$P(d_1 a_2)=0,29$	$P(d_2 a_2)=0,71$

A partir das tabelas anteriores, obtém-se a tabela conjunta (Tabela 13),  $P(A, B, C, D)$ , contendo dezesseis valores, dados pela equação 21.

$$P(A, B, C, D) = P(A) * P(B|A) * P(C|A) * P(D|A) \quad \text{Equação (24)}$$

Tabela 13 - Probabilidade conjunta.

$P(a_1, b_1, c_1, d_1)$	$P(a_1, b_1, c_1, d_2)$	$P(a_1, b_1, c_2, d_1)$	$P(a_1, b_1, c_2, d_2)$
<b>0,332</b>	<b>0,093</b>	<b>0,116</b>	<b>0,032</b>
$P(a_1, b_2, c_1, d_1)$	$P(a_1, b_2, c_1, d_2)$	$P(a_1, b_2, c_2, d_1)$	$P(a_1, b_2, c_2, d_2)$
<b>0,083</b>	<b>0,031</b>	<b>0,029</b>	<b>0,029</b>
$P(a_2, b_1, c_1, d_1)$	$P(a_2, b_1, c_1, d_2)$	$P(a_2, b_1, c_2, d_1)$	$P(a_2, b_1, c_2, d_2)$
<b>0,129</b>	<b>0,036</b>	<b>0,045</b>	<b>0,012</b>
$P(a_2, b_2, c_1, d_1)$	$P(a_2, b_2, c_1, d_2)$	$P(a_2, b_2, c_2, d_1)$	$P(a_2, b_2, c_2, d_2)$
<b>0,032</b>	<b>0,009</b>	<b>0,011</b>	<b>0,003</b>

Para o caso em que o nó B é observado como  $B = b_2$ , realiza-se um processo de inferência para os nós A e C. Para  $P(a_1 | B = b_2)$ , por exemplo, realiza-se o seguinte cálculo:

$$P(a_1 | B = b_2) = \frac{P(a_1, b_2, c_1, d_1) + P(a_1, b_2, c_1, d_2)}{P(a_1, b_2, c_1, d_1) + P(a_1, b_2, c_1, d_2) + P(a_1, b_2, c_2, d_1) + P(a_1, b_2, c_2, d_2)} +$$

$$+ \frac{P(a_1, b_2, c_2, d_1) + P(a_1, b_2, c_2, d_2)}{P(a_2, b_2, c_1, d_1) + P(a_2, b_2, c_1, d_2) + P(a_2, b_2, c_2, d_1) + P(a_2, b_2, c_2, d_2)}$$

Como é observado que  $\{B = b_2\}$ , todas as probabilidades em  $P(A, B, C, D)$  contendo  $b_1$  não são utilizadas. Realizando-se o processo anterior para todos os estados de A, C e D, obtém-se as probabilidades condicionais para cada nó, exibidas na Tabela 14:

Tabela 14 - Probabilidades condicionais para cada nó.

$P(a_1   B = b_2) = 0,75$	$P(c_1   B = b_2) = 0,86$	$P(d_1   B = b_2) = 0,79$
$P(a_2   B = b_2) = 0,25$	$P(c_2   B = b_2) = 0,14$	$P(d_2   B = b_2) = 0,21$

Nas Tabelas 15 e 16 encontram-se listados as probabilidades condicionais iniciais para uso na rede bayesiana completa, sendo na primeira coluna de cada tabela considerada as possíveis combinações de país, e na primeira linha as categorias dos nós.

Tabela 15 - Utilização dos *Lactobacillus* em função do tratamento com os sobrenadantes dos *Lactobacillus*.

Variáveis Condicionantes	Sim	Não
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 = neutralizado	83,30	16,70
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 = talqual	88,90	11,10
<i>Lactobacillus sake</i> ATCC 15521 = neutralizado	83,30	16,70
<i>Lactobacillus sake</i> ATCC 15521 = talqual	88,90	11,10
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> H-19 = neutralizado	83,30	16,70
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> H-19 = talqual	88,90	11,10

Tabela 16 - Redução do tempo de sobrevida em função do *Lactobacillus* e do tratamento (Grupo dos microrganismos patogênicos)

Variáveis Condicionantes	Sim	Não
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313=neutralizado	82,40	17,60
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313=talqual	58,09	41,91
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922=neutralizado	81,90	18,10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922=talqual	63,00	37,00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923=neutralizado	82,40	17,60
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923=talqual	57,69	42,31

O processo de inferência é a base da utilidade das redes Bayesianas. Existem algoritmos eficientes em tempo e espaço, que não exigem o cálculo de todas as tabelas conjuntas (JENSEN, 2001).

#### 4.4.7 “Noisy-nor”

O modelo “noisy-nor” (HECKERMAN; BREESE, 1994) permite calcular as probabilidades a partir de outras e não especificadas diretamente, com as restrições de que os pais do nó possam contribuir independentemente para a probabilidade do nó em que é aplicado o modelo.

Para este trabalho, é necessário que o nó em questão também seja binário, isto é, possua somente duas categorias: verdadeiro ou falso. No caso, uma redução da concentração inibitória mínima pode ser atingida, devido aos vários fatores de risco/causa. Para o nó inibição do microrganismo *E. coli*, os fatores risco/causa são: tempo, temperatura, pH e atividade de água, junto a um dos sobrenadantes. Foi utilizado o modelo “noisy-nor” para os nós *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*.

Modelando o sistema de sobrevivência dos microrganismos, tem-se um nó C com categorias c representando uma redução do crescimento, cujas causas são:  $r_1, r_2, \dots, r_n$ . As probabilidades para C são dadas pela tabela conjunta de probabilidades condicionais  $P(C|r_1, r_2, \dots, r_n)$ .

Os valores iniciais para o cálculo são as probabilidades condicionais  $P(C|r_1, r_2, \dots, r_n)$ , obtidas a partir da Análise de Sobrevivência, sistemas especialistas ou dados bibliográficos.

Obtêm-se as probabilidades de link a partir das probabilidades condicionais, calculando-se (NIKOVSKI, 2000):

$$P_r C_k = \frac{P(c|r_i C_k) - P(c|r_i C_l)}{1 - P(c|r_i C_l)} \text{ se } k \neq l \quad \text{Equação (205)}$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo das forças antagônicas que agem sobre o crescimento dos microrganismos patógenos na presença de uma bactéria ácido-lática, o desfecho de interesse acontece quando os valores de absorvância atingem a concentração inibitória mínima (Equação 14).

Na Figura 18, estão apresentados os tempos verificados, experimentalmente, para os 3 microrganismos em estudo. O símbolo (o), indica censura (neste caso, todas as censuras ocorreram ao término do estudo), e o símbolo (•) indica a ocorrência de falha, isto é, o momento no qual o microrganismo atingiu a concentração inibitória mínima. Como um microrganismo pode voltar a assumir um aumento nos valores de absorvância após haver atingido uma concentração inibitória mínima em função do aumento dos metabólitos (bacteriocinas, ácido láctico, etc.), pode-se relatar que este fato trata-se de um evento recorrente: o microrganismo volta a fazer parte do grupo de risco, devendo ser observado até o final do estudo.

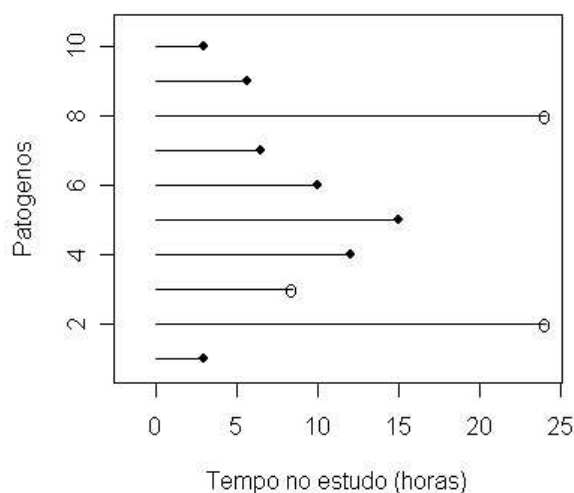


Figura 18 - Ocorrência de falha (•) ou censura (o) dos microrganismos.

Pode-se observar da Figura 18 que a maioria dos microrganismos atingiu sua CIM na sexta hora de acompanhamento, onde os valores de absorvância ficaram inferiores aos obtidos nas soluções de controle. A retomada do crescimento após o episódio de redução, foi considerada como um único episódio para não inflacionar a taxa de incidência uma vez que a frequência do tempo de sobrevivida é pequena.

### 5.1 DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS SOBRENADANTES TQ E N

Nas Figuras 19(a) e 19(b), estão ilustradas as curvas da função de sobrevivência em sobrenadante neutralizado e TQ, respectivamente. Inicia-se com  $S(0) = 1$ , ou seja, onde a probabilidade de um microrganismo sobreviver no início do estudo é 1, ou, 100%, neste caso, inicia-se a fase Lag na qual todos os microrganismos estão adaptados ao meio, para iniciar o processo de crescimento exponencial.

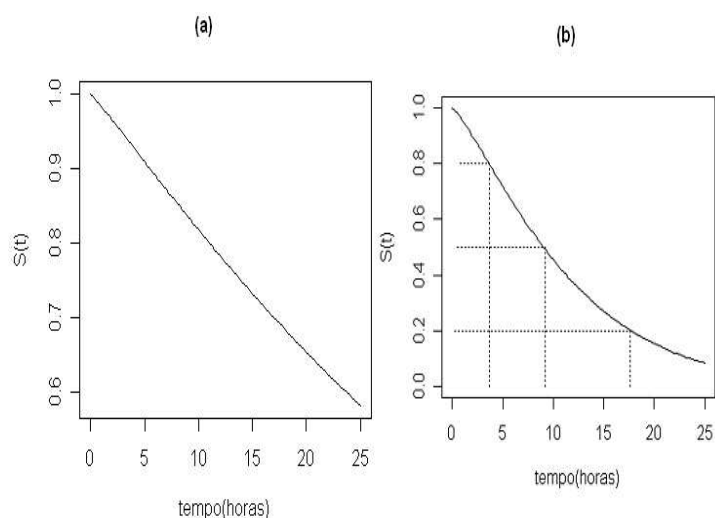


Figura 19 - (a) Sobrevida dos microrganismos patógenos mediante a utilização do sobrenadante neutralizado; (b) utilização do sobrenadante TQ.

A função de sobrevivência  $S(t)$  decresceu rapidamente conforme a Figura 19(a), indicando, como conseqüência, uma diminuição acentuada da taxa de sobrevivência dos

microrganismos patógenos. Somente 40% dos microrganismos tiveram sobrevida abaixo do tempo de estudo, isto é, inferior a 24 h, sendo a sobrevida média de 9 h. Os 60% restantes foram representados pelo *S. aureus*, que não apresentou redução em sua concentração inibitória mínima durante o tempo de estudo com a utilização do sobrenadante *L. sake*. Este resultado será comprovado, posteriormente, no estudo do crescimento individual.

Com a utilização do sobrenadante TQ, conforme mostrado na Figura 19(b), o tempo mediano de sobrevida dos microrganismos correspondeu a, aproximadamente, 9 h. Este foi o tempo em que 50% dos microrganismos em estudo ainda não haviam experimentado uma redução de sua concentração inibitória mínima ( $S(9)=0,5$ ). Os percentuais 80 e 20 representam o tempo em que os microrganismos sobreviveram ao tratamento.

A probabilidade de um microrganismo sobreviver 3 h foi de 80%. Em 9 h, 50% dos microrganismos já haviam apresentado uma redução em sua absorvância e, em 24 h, 20% dos microrganismos ainda não haviam atingido a redução em sua concentração inibitória mínima.

O interesse está nas curvas que decrescem rapidamente, uma vez que se tem como resposta o tempo até que o microrganismo atinja sua concentração inibitória mínima. Esta representação está melhor identificada na Figura 19(b), por apresentar decréscimo mais acentuado em relação ao tempo.



## 5.2 EFICÁCIA DOS SOBRENADANTES COMO INIBIDORES DE CRESCIMENTO

Com o objetivo de avaliar a eficácia do antagonismo promovido pela utilização das bactérias lácticas como inibidor de crescimento dos microrganismos patogênicos, foram comparados os três grupos de sobrenadantes usando a técnica de análise de sobrevivência por meio do estimador de Kaplan-Meier. O valor da estatística “log-rank” (Equação 18) apresentada na Tabela 17 que, sob a hipótese de igualdade das curvas de sobrevivência, tem uma distribuição qui-quadrado com dois graus de liberdade com valor de 4,1 ( $p=0,12$ ), indica a não existência de diferenças entre o tempo de sobrevida dos microrganismos pela utilização dos sobrenadantes.

Tabela 17– Distribuição da ocorrência de eventos pela estatística de “log-rank”.

	N	Observado	Esperado	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
<i>L. acidophilus</i>	108	108	66,8	0,086	0,345
<i>L. rhamnosus</i>	108	108	105,2	0,516	1,930
<i>L. Sake</i>	108	102	106,0	1,000	3,881

Nota.  $\text{Chisq} = 4,1$ , com 2 graus de liberdade,  $p = 0,128$

## 5.3 SOBRENADANTE COM TRATAMENTO NEUTRALIZADO

Na Tabela 18, estão apresentadas as probabilidades de sobrevida dos microrganismos em função da utilização dos sobrenadantes mediante ao tratamento neutralizado. Aproximadamente 96% dos patógenos não apresentaram redução do índice de CIM com a utilização do sobrenadante. Aproximadamente 66%, apresentaram sobrevida após 6 h. No intervalo de 3 a 6 h, a probabilidade de que todos os microrganismos estivessem vivos foi de 35%. Com 24 h, 5% dos

microrganismos em estudo foram censurados à direita por não apresentarem redução na absorvância.

Tabela 18 – Estimativas S(t) para a sobrevida dos microrganismos patogênicos com o uso do sobrenadante neutralizado.

Tempo (h)	n.risco	n.event	sobrevida	std.err	CI inferior 95%	CI superior 95%
0	84	3	0,9654	0,0196	0	0,840
3	19	1	0,6667	0,0907	0,5106	0,670
6	7	1	0,3556	0,1071	0,1970	0,642
24	2	1	0,0593	0,0570	0,0090	0,390

Fonte: Autor (2007)

A inibição de microrganismos potencialmente patogênicos por metabólitos obtidos a partir do crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, já foi descrita em estudos anteriores de González et al. (1993), Fang et al. (1996) e Ogawa et al. (2001), corroborando os resultados. A ação do ácido láctico foi apontada por eles como o principal mecanismo de inibição.

#### 5.4 ESTUDO UTILIZANDO O TRATAMENTO TQ

No início da observação (tempo 0), 97% dos microrganismos não haviam apresentado uma redução em sua concentração inibitória mínima. Após a terceira hora, a estimativa de sobrevida era de 51%, reduzindo para 38% na sexta hora. Pela Tabela 19, pode-se observar também que em 24 h, aproximadamente 25% dos microrganismos não apresentaram uma redução dos valores de absorvância em relação ao grupo controle, sendo censurados a direita.

Tabela 19 – Estimativas S(t) para os dados do tratamento TQ.

Tempo (h)	n.risco	n.event	sobrevida	std.err	CI inferior 95%	CI superior 95%
0	87	2	0,9770	0,0161	0	0,970
3	40	1	0,5109	0,0564	0,5106	0,860
6	30	1	0,3799	0,0551	0,1970	0,532
24	21	2	0,2489	0,0493	0,0980	0,365

Fonte: Autor (2007).

*Lactobacillus plantarum* exerce efeito inibitório sobre um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas, dentre elas *Listeria innocua* e *Escherichia coli* (LASH et al., 2005). Segundo estes autores o efeito de inibição do sobrenadante suspensão de *L. plantarum*, quanto a sua estabilidade frente a diferentes temperaturas e pH, sobre espécies de bactérias patogênicas perdem a atividade antimicrobiana em temperaturas superiores a 30°C e o mesmo ocorre quando o pH é ajustado para valores maiores que 5,0 e menores que 4,0, sugerindo que o composto causador da inibição é ativo somente nessa faixa de pH. Talvez este fato justifique a incidência de microrganismos que foram censurados após 24 h de estudo no presente trabalho, com o uso do sobrenadante TQ.

### 5.5 MODELO FINAL

Após obtidas as probabilidades iniciais com o uso da análise de sobrevivência, foi feita uma última avaliação com casos em que os nós das variáveis de influência não foram observados, simulando a falta destas informações por não estarem disponíveis.

O nó temperatura trabalha somente com duas possibilidades, ou seja, a utilização ou não da temperatura ideal para o crescimento, no caso, condicionada a 37 °C. Se for utilizada a temperatura padrão, tem-se 99% de chances do microrganismo crescer no meio, contra apenas 1% caso contrário.

O modelo apresentado na Figura 20 caracteriza as suas probabilidades iniciais, construído de acordo com as variáveis pré-selecionadas, utilizando-se como partida os resultados de probabilidade obtidos na Análise de Sobrevivência.

Todos os nós têm uma probabilidade alta para a categoria sim, indicando que a variável foi utilizada no modelo. Foi observada uma sobrevivência de, aproximadamente, 52% dos microrganismos patógenos nestas condições.

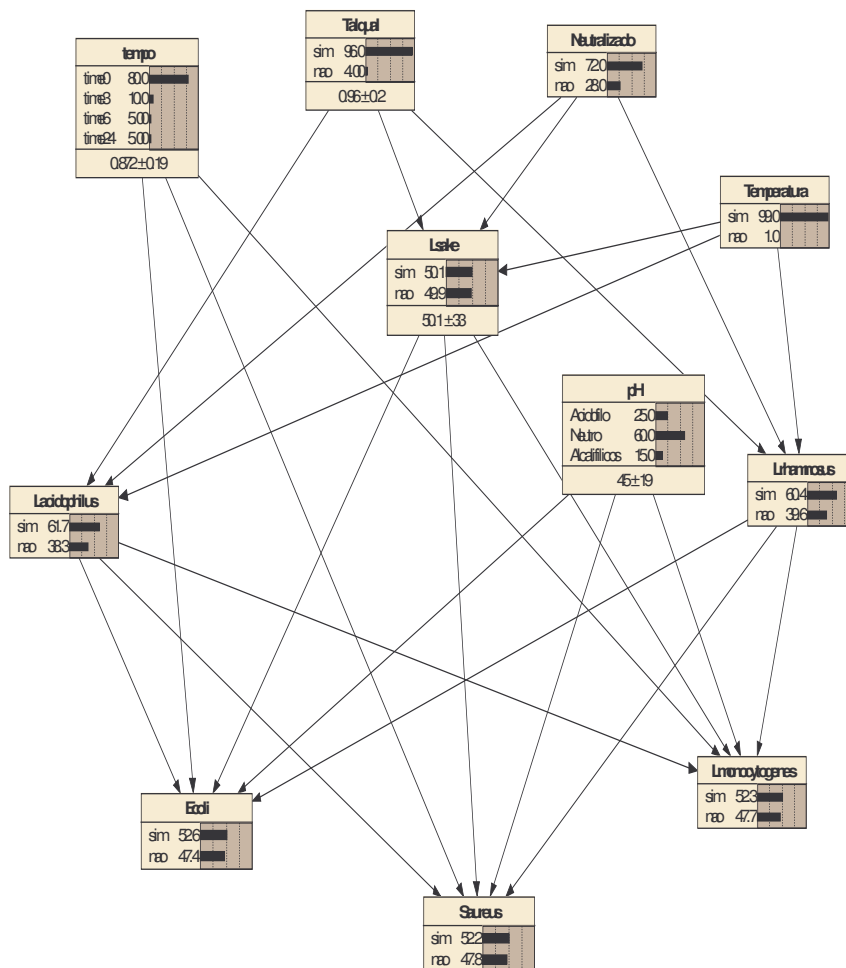


Figura 20 - Modelo construído de acordo com as variáveis pré-selecionadas.

Na Figura 21, encontra-se representado, esquematicamente, o caso em que se utiliza o tratamento TQ, com a temperatura de 37 °C, pH neutro e o sobrenadante do *L. acidophilus*. O resultado mostrou que, aproximadamente, 46% dos microrganismos *E. coli* e *S. aureus* tiveram uma redução em sua carga inibitória mínima, contra 48% para o microrganismo *L.monocytogenes*.

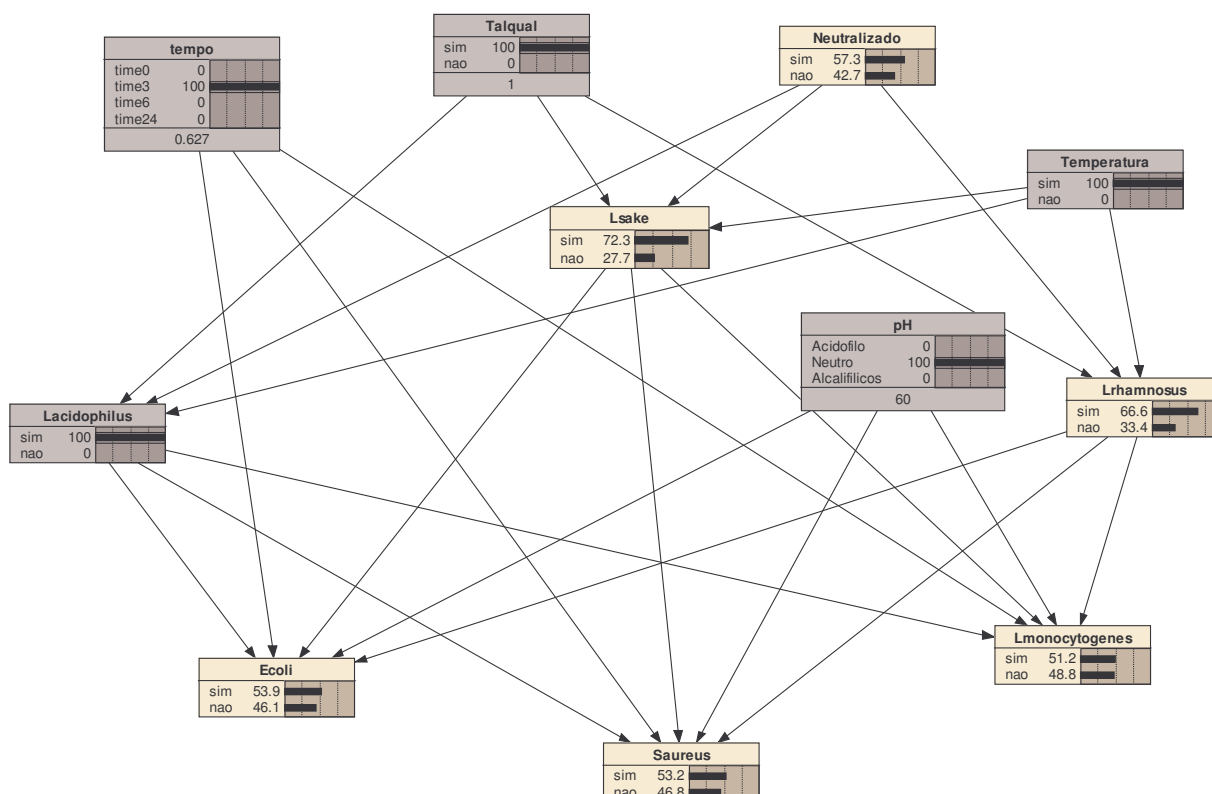


Figura 21 - Modelo utilizando *L. acidophilus*, com o tratamento TQ em 3 h.

Em 6 h, a sobrevivência dos microrganismos *S. aureus* e *L. monocytogenes* teve uma redução em torno de 4% (Figura 22), enquanto que para o microrganismo *E. coli* não houve alteração em termo de estimativas, mantendo-se constante as demais variáveis.

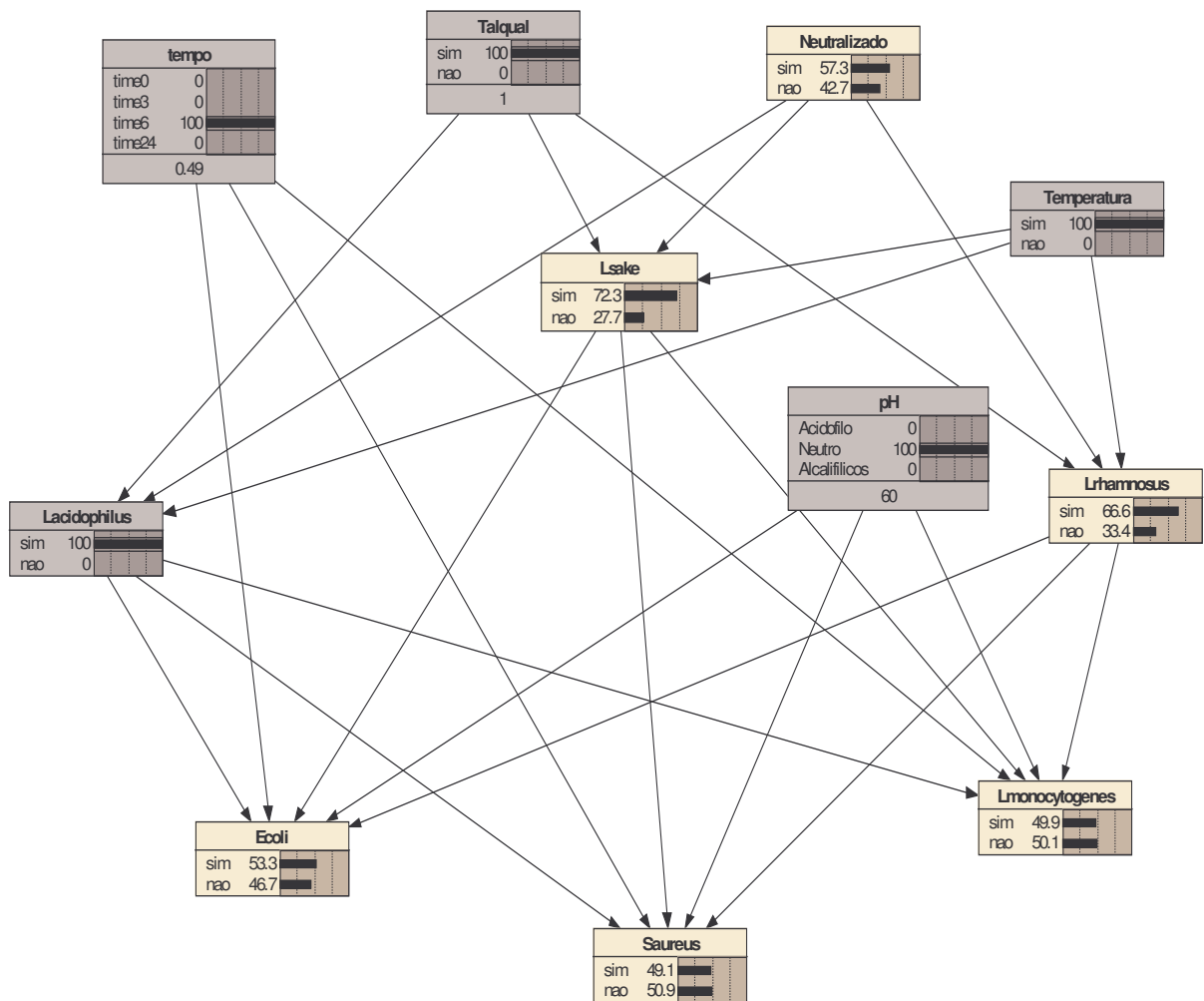


Figura 22 - Modelo utilizando *L. acidophilus*, tratamento TQ, em 6 h.

Na Figura 23, está representada, esquematicamente, a utilização do sobrenadante *L. acidophilus*, com o tratamento neutralizado com a tomada de tempo em 3 h, mantendo-se constante a variável temperatura e o pH neutro. Observou-se que as chances de sobrevivência reduziram para 44% em 3 h para os microrganismos *E. coli* e *S. aureus*, sendo mantida a sobrevivência do microrganismo *L. monocytogenes* em 48% após 3 h.

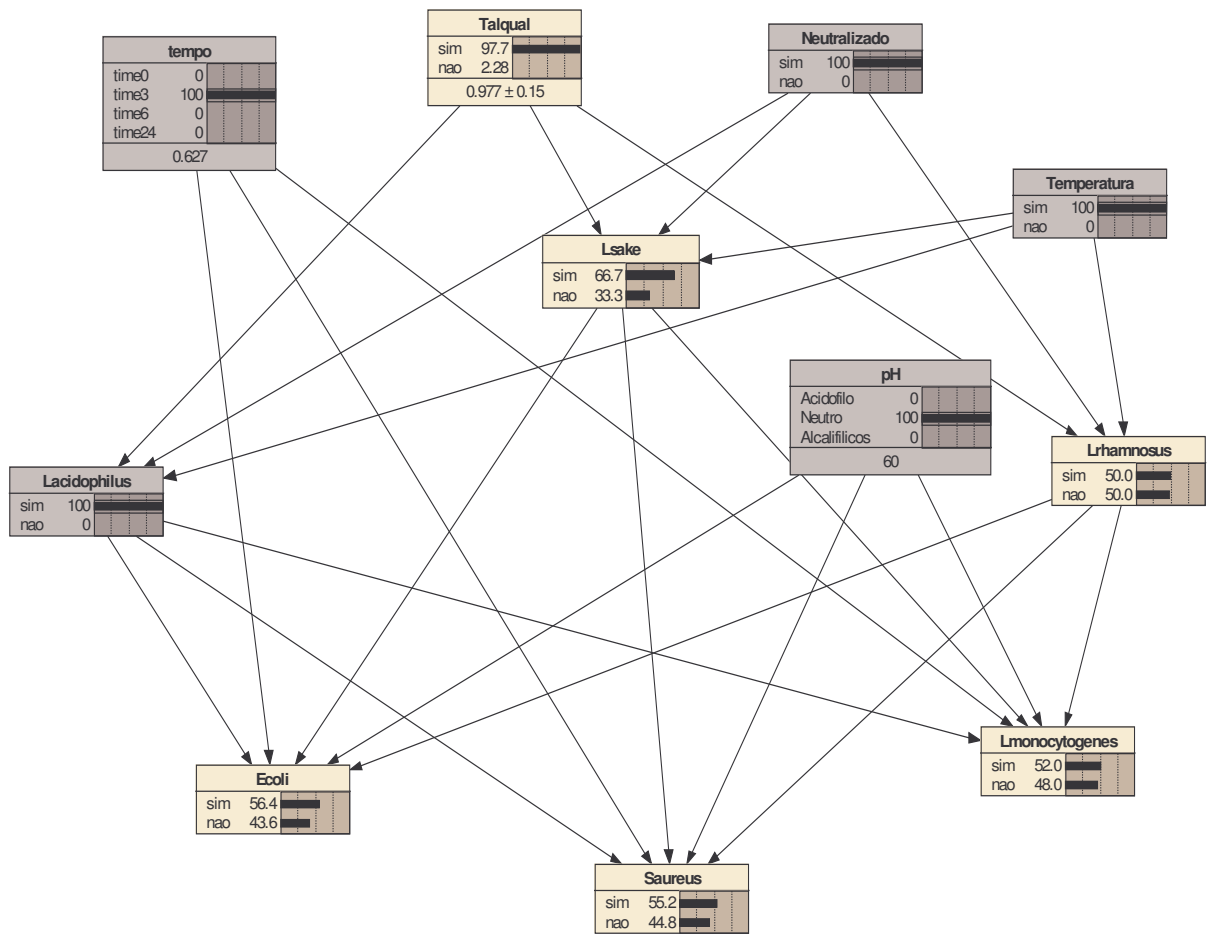


Figura 23 - Modelo utilizando *L. acidophilus*, tratamento neutralizado, em 3 h.

Em 6 h o patógeno *E. coli*, apresentou 44% de sobrevivida, contra, aproximadamente, 50% do *L. monocytogenes* e 51% do *S. aureus* com o tratamento neutralizado (Figura 24). O microrganismo *E. coli* apresentou redução em sua CIM em 3 h, ao passo que os outros dois microrganismos apresentaram melhores resultados em 6 h na presença do sobrenadante.

No Quadro 1, encontra-se demonstrado que a rede está bem ajustada. Observou-se que, a partir de 6 h de acompanhamento, os percentuais de sobrevivências atingiram patamares em torno de 50%, o que se corrobora com a Análise de sobrevivência que apontou uma redução na CIM para 50% em torno de 9 h.

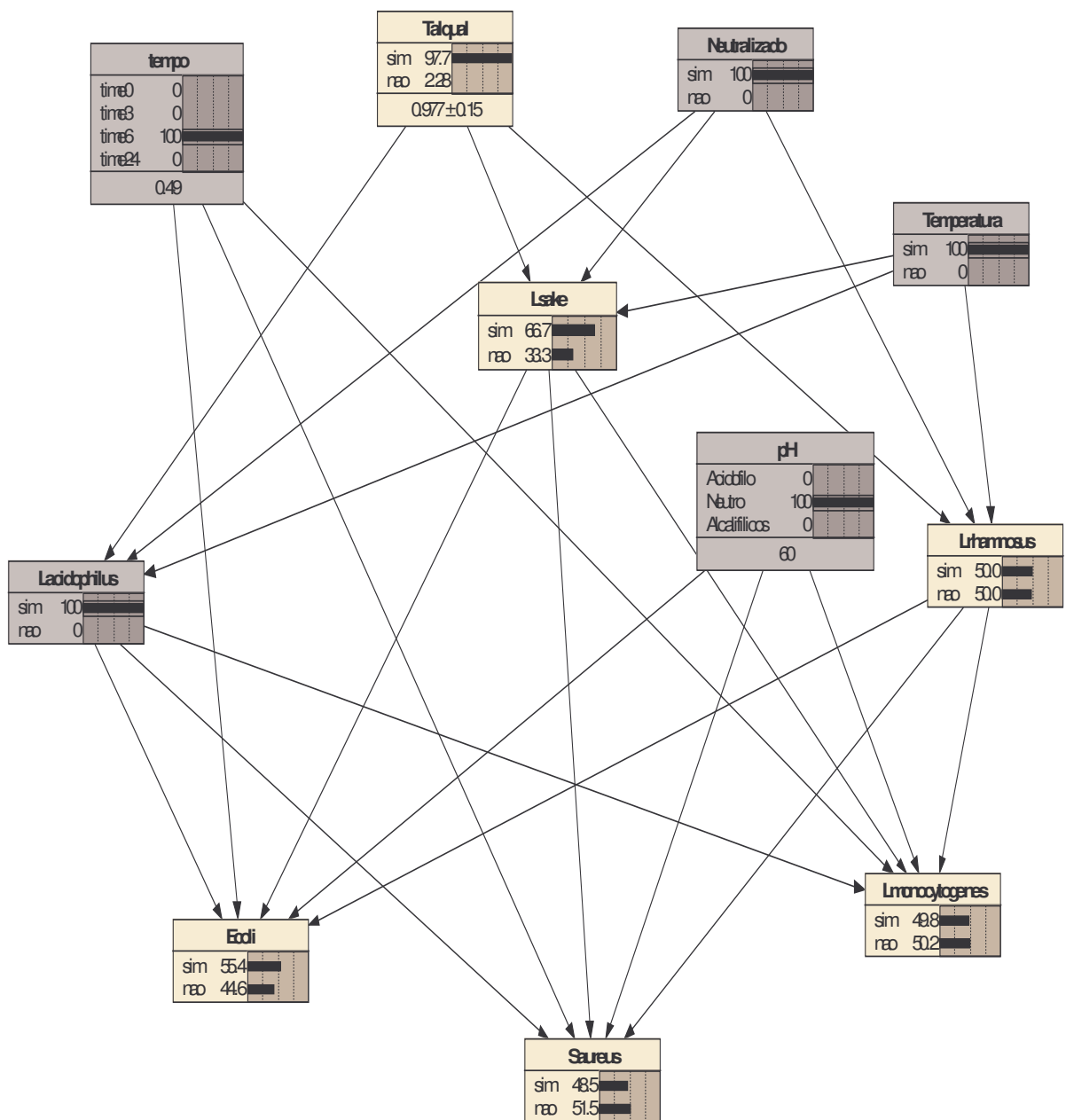


Figura 24 - Modelo utilizando *L. acidophilus*, tratamento neutralizado, em 6 h.



Quadro 1 – Simulação das probabilidades de sobrevivência dos microrganismos patógenos pela rede Bayesiana.

Tempo (h)	Sobrenadante	<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. Coli</i>		<i>S. aureus</i>	
		TQ	N	TQ	N	TQ	N
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	<i>L.acidophilus</i>	54,7	57,7	54,5	57,3	54,3	56,9
	<i>L.rhamnosus</i>	57,5	57,6	57,2	57,3	56,8	56,9
	<i>L.sake</i>	60,1	61,4	59,7	60,9	59,2	60,4
3	<i>L.acidophilus</i>	51,2	52,0	53,9	56,4	61,6	55,2
	<i>L.rhamnosus</i>	59,0	56,3	56,1	70,1	55,0	66,6
	<i>L.sake</i>	52,6	53,0	58,4	59,5	56,9	57,8
*6	<i>L.acidophilus</i>	49,9	49,8	53,3	55,4	53,2	48,5
	<i>L.rhamnosus</i>	49,8	49,8	55,3	55,4	48,5	48,5
	<i>L.sake</i>	49,8	49,8	57,1	58,0	48,0	47,7
24	<i>L.acidophilus</i>	48,1	46,9	51,5	52,4	47,7	46,3
	<i>L.rhamnosus</i>	46,9	47,0	52,4	52,4	46,3	46,4
	<i>L.sake</i>	45,8	45,3	53,2	53,6	45,0	44,3

Os valores observados na sexta hora na tabela acima foram semelhantes aos resultados obtidos pela análise de sobrevivência (Tabelas 18 e 19). Isto demonstra a robustez da rede Bayesiana para definir as probabilidades de sobrevivência dos microrganismos dentro das condições especificadas. O emprego das probabilidades obtidas pela técnica de análise de sobrevivência como parâmetros iniciais da rede Bayesiana possibilitou uma rápida convergência aos resultados finais. Os

resultados obtidos com o uso dos sobrenadantes não apresentaram diferenças significativas na vigésima quarta hora ( $p>0,05$ ). O microrganismo *E.coli* teve o maior percentual de sobrevivência no término do acompanhamento (52%), contra 46% de sobrevivência do *S.aureus* e *L.monocytogenes*.

## 6 CONCLUSÕES

As bacteriocinas extraídas dos lactobacilos apresentaram uma discreta redução na sobrevivência dos microrganismos patógenos comprovados pela leitura de absorbância a 660 nm, quando comparados com o controle, comprovando assim existir um antagonismo entre os lactobacilos e os patógenos.

A rede Bayesiana foi útil para prever a probabilidade de sobrevivência dos microrganismos *Escherichia Coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, quando utilizado os sobrenadantes obtidos dos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sake* e *Lactobacillus rhamnosus*.

O desempenho da rede Bayesiana foi considerado adequado, ou seja, as probabilidades fornecidas pela rede foram semelhantes aos resultados obtidos em estudos efetuados por El-Naggar (2004) que demonstraram a atividade antagônica das cepas lácticas frente a *E. coli*.

As probabilidades iniciais definidas pela técnica de Análise de Sobrevivência possibilitou uma rápida convergência para os valores finais da rede, economizando esforço computacional. Também, a utilização do modelo “Noysi-nor” colaborou com o bom desempenho da rede.

A rede Bayesiana mostrou que se podem criar situações que simulam o comportamento vital dos microrganismos, bastando para isto um cuidado na escolha das variáveis iniciais, que contemplem a maioria dos parâmetros que possam afetar o ciclo de vida com a intenção de inferir no resultado final.

A simulação da curva de sobrevivência dos microrganismos patógenos para a caracterização da vida de prateleira mostrou

que é possível utilizar a metodologia da rede Bayesiana para determinar um intervalo de tempo de armazenamento do produto.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas para estudos futuros, foram levantados os seguintes tópicos, que poderão contribuir para o progresso da segurança alimentar:

- aplicar o modelo proposto a produtos de origem animal e vegetal;
- obter mais informações sobre os microrganismos patogênicos e seus efeitos no homem e no alimento em relação a competitividade;
- estudo da curva de sobrevivência de cada microrganismo patogênico e respectivos modelos matemáticos que mais se ajustam;
- obtenção de parâmetros de processos de várias empresas fabricantes de alimentos para posterior aplicação do modelo e comparação dos resultados;
- aprimorar novas alternativas e correlacioná-las aos seus custos de implementação; e,
- desenvolver software que possibilite simulações a respeito do processo com resultados imediatos da vida útil do produto.

## 8 REFERÊNCIAS

- CARVALHO, M.S.; ANDREOZZI, V.L.,CODEÇO,C.T. Análise de sobrevida: teoria e aplicação em saúde.Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 2005.
- BAREFOOT, S. F.; KLAENHAMMER, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.45, n.6, p.1808-1815, 1983.
- BAYES, T. An essay towards solving a problem in the doctrine of chance. Philos. Trans. Roy. Soc. London 53: 1763. 370–418.
- BETTELHEIM, K.A.;*Eschericia coli*, [www.aciencenet.com.au](http://www.aciencenet.com.au) (acesso em 28.06.2007).
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. et al. Biology of Microorganisms. New Jersey: Prentice-Hall, 1994. 909p.
- BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology. Trends Food Sci. Technol., 4:6-11, 1993 (b).
- CEBECI, A.; GUARAKAN, C. Properties of potencial probiotic *Lactobacillus plantarum* strains, Food Microbiology, v.20, p.511-518, 2003.
- CHUMCHALOVÁ, J.; JOSEPHSEN, J.; PLOCKOVÁ, M.The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO<sub>3</sub> and lysozyme. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.43, n.1-2, p.33-38, 1998.
- COLOSIMO, E. A., GIOLO, S. R. Análise de sobrevivência aplicada. São Paulo, editora Edgard Blucher, 2006.
- COX D.R., Regression Models on life tables. Journal of the Royal Statistical Society, Series B, 34, 1972. 187-220.
- COWELL, R.G. et al. Probabilistic Networks and Expert Systems. New York: Springer, p.5-23, 1999.
- DRAPPER, N. R., SMITH, H., Applied regression analysis, 2 ed. New York: jonhWiley and Sons, 1981. Apud. McMeekin, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T.,RATKOWSKY,D.A., Predictive microbiology:theory and application. Tauton:Research Studies, 1993.p.1-86.
- El-Naggar, M. Y. M. , Comparative study of Probiotic cultures to control the growth of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella tybhimurium*. Biotechnology, 3, 2004. 173-180.

FANG, W.; SHI, M.; HUANG, L.; CHEN, J.; WANG, Y. Antagonism of lactic acid bacteria towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and milk. *Veterinary Research, Paris*, v.27, n.1, p.3-12, 1996.

FARBER, J.M. Predictive modeling of food deterioration and safety. In: PIERSON, M.D., STERN, N.J. *Foodborne microorganisms and their toxins*. New York: Marcel Dekker, 1986. p.57-90.

FERREIRA, C.L.F. Grupo de Bactérias Lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.F, *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003, p. 7-34.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 13-24, 1996.

FRIEDMAN, N.; GEIGER, D.; GOLDSZMIDT, M. Bayesian network classifiers. *Machine Learning*, Vol.29, pp.131-163.1997.

FREEMAN, Bob A; *Microbiología de Burrows* 22a Edición, Editorial Interamericana, Espanha 1986. P. 57-62.

FU, B., TAUOKIS, P.S., and LABUZA, T.; Predictive microbiology for spoilage of dairy products with time temperature integrators. *J.Food Sci.*56:1209-1215.

GIBSON, A.M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.*, 62:479-490, 1987.

GOLDBLITH, S.A., JOSLYN, M.A., NICKERSON, J.T.R. An introduction to thermal processing of foods. Vol. 1, Westport: AVI, 1961. 1128p. Apud: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. *Food microbiology - fundamentals and frontiers*. Washington: ASM, 1997, p.728-739.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X.; *Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas*. *Biotechnology Alimentar*. v. 64, p. 12-22, 1999.

GONZÁLEZ, S.N.; APELLA, M.C.; ROMERO, N.C.; DE MACÍAS, M.E.N.; OLIVER, G. Inhibition of enteropathogens by *Lactobacillus* strains used in fermented milk. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.56, n.9, p.773-776, 1993.

GLASS, K.A., LOEFFELHOLZ, J.P., DOYLE, M.P., Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*58, 1991

HECKERMAN, D.; GEIGER, D.; CHICKERING, D. Learning Bayesian networks: The combination of knowledge and statistical data. *Machine Learning*, v. 20, n.3, p.197-243, 1995.

HECKERMAN, D. BREESE, J. A new look at causal independence. In: Proceedings of the 10th Conference on Uncertainty in Artificial Intelligence. Morgan Kaufmann, p.286-226, 1994.

HOLT J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. & Williams S. T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edn. Baltimore: Williams & Wilkins, 789p

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A. L. DAVIDSON, P.M.Ed.Antimicrobial in Foods. Marcel Deckker Inc.,New York,USA,1983, p.327-351.

[ICMSF] International Commission on Microbiological Specification for Foods. 1980. Microbial ecology of foods. Volume 1, Factors affecting life and death of microorganisms. Orlando: Academic Pr. p 311.

JENSEN, F.V. Bayesian Networks and Decision Graphs. New York:Springer, 2001.

KAPLAN E.L. & MEIER P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of the American Statistical Association, 53: 4457 – 4481

KUNTZ, T.B.; KUNTZ, S.T.; Enterohemorrhagic *E. coli* Infection. Fourth Prize Paper. v.6, p. 192-196.

LEVINE,M.M.;KAPER,.B.;LIOR,H.;PRADO,V.;TALL,B.;NATAN,J.;KARCH ,H.ACHSMUTH,K.; A DNA – probe to identify enterohemorrhagic *Eschechia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome.Journal infective disease. V.-156 p 175-182,1987.

LASH, B.W.; MYSLIWIEC, T.H.; GOURAMA, H.; MYSLIWIEC, T.H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Food Microbiology. v. 22, p. 199-204, 2005.

LILLY, D.M.; STILLWEL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. Science, Washington, v.147,n.3659, p.747–748, 1965.

MANTEL N., 1966 Evaluation of Survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. Cancer Chemotherapy Reports, 50 ( 3): 163-170

McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. Predictive microbiology: theory and application. Taunton: Research Studies, 1993. p.1-86.

MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M.; DROSINOS, E.H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Sci., v. 64, p. 265-271, 2003.



MEYER, Paul L. Probabilidade: Aplicações à Estatística. Rio de Janeiro: LTC, 1975.

NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRE, C.D.S.;FRANCO, B.D.G.M; Aspectos básicos da microbiologia preditiva. Capturado em 27 de julho 2007. Online. Disponível na Internet: <http://www.ital.org.br/brazilianjournal>

NIKOVSKI, D. Constructing Bayesian networks for medical diagnosis from incomplete and partially correct statistics. IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering, v.12, n.4, p.509–516, 2000.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.68, n.1-2, p.135-140, 2001.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. Goiânia: Editora da UFG, v.1, p.277-291, 2001.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Animal Nutrition Health, n.29, p.4-8, 1974.

PELCZAR, J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia – Conceitos e Aplicações. 2.ed. São Paulo: Makron Books, v.1, cap.8, p. 166-174; 211-223, 1996.

PETO R, PIKE MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J, Smith PG (1977) Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples. Br J Cancer 35: 1–39.

RACCACH, M.; McGRATH, R.; DAFTARIAN, H. Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.9, n.1, p.25-32, 1989.

ROBERTS, T.A., JARVIS, B. Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. In: ROBERTS, T.A., SKINNER, F.A. Food microbiology: advances and prospects. New York: Academic Press, 1983, p.85-95.

ROSS, T., McMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol., 23:241-264, 1994.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos, uma estratégia seqüencial de planejamentos. SP, Casa do Pão,168, 2005

ROSS, T., McMEEKIN, T.A. Predictive microbiology: Applications of a square root model. Food Aust., 43:202-207, 1991.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1418± 1434. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

Schillinger, U.; LÜCKE, F-K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., v. 55, p. 1.901-1.906, 1989.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. Journal Dairy Science, v.83, p.894-907, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2.ed. rev. ampl. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317 p.

WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L. Predictive Modeling. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. Food microbiology - fundamentals and frontiers. Washington: ASM, 1997, p.728-739.

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

Wood, B. J. B.; Holzapfel, W. H.; The lactic acid bacteria in health & disease. New York: Elsevier Applied Science, London, 1992, 485p.

**APÊNDICE A – Valores de densidade ótica referentes à utilização do sobrenadante *L.acidophilus*.**

Valores de densidade ótica referentes à utilização do sobrenadante *L.acidophilus*.

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.078	0.076	0.085	0,079
3	0.082	0.090	1.069	0,649
6	0.081	0.259	0.033	0,367
24	0.161	0.205	0.096	0,087

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Escherichia coli O157:H7</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.080	0.078	0,084	0,079
3	0.083	0.113	0,951	0,649
6	0.082	0.238	0,344	0,367
24	0.142	0.369	0,096	0,087

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Staphilococcus aureus</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.080	0.077	0.086	0,079
3	0.081	0.155	1.076	0,649
6	0.081	0.411	0.345	0,367
24	0.149	0.797	0.010	0,087

**APÊNDICE B – Valores de densidade ótica referentes à utilização do sobrenadante *L. sake*.**

Valores de densidade ótica referentes à utilização do sobrenadante *L. sake* .

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.081	0.076	0.016	0,139
3	0.082	0.091	0.084	0,080
6	0.082	0.082	1.043	0,785
24	0.167	0.205	0.348	0,271

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Escherichia coli O157:H7</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.083	0.078	0,155	0,139
3	0.088	0.113	0,083	0,080
6	0.088	0.238	1,051	0,785
24	0.188	0.369	0,308	0,271

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Staphilococcus aureus</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>Talqual</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.081	0.077	0.186	0,139
3	0.082	0.090	0.084	0,080
6	0.082	0.259	1.043	0,785
24	0.182	0.797	0.415	0,271

**APÊNDICE C – Valores de densidade ótica referentes à  
utilização do sobrenadante *L.rhamnokus*.**

Valores de densidade ótica referentes à utilização do sobrenadante *L.rhamnusus*.

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.080	0.076	0.418	0,476
3	0.083	0.090	0.187	0,142
6	0.082	0.259	0.082	0,075
24	0.167	0.205	0.744	0,640

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Escherichia coli O157:H7</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.083	0.079	0,326	0,476
3	0.085	0.113	0,157	0,142
6	0.085	0.238	0,082	0,075
24	0.188	0.369	0,700	0,640

<b>Tempo</b> (horas)	<b><i>Staphilococcus aureus</i></b> (densidade ótica - 660nm)			
	<b>TQ</b>	<b>Controle</b>	<b>Neutralizado</b>	<b>Controle</b>
0	0.081	0.077	0.410	0,476
3	0.083	0.155	0.182	0,142
6	0.083	0.411	0.084	0,075
24	0.192	0.797	0.711	0,640



ANEXO A – Valores de absorvância para amostra neutralizada.

**Valores de absorvância para amostra neutralizada.**

BAL	Patógeno	pH	REP	Absob	controle	t	Estado
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,084	0,079	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,084	0,077	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,084	0,080	0	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,087	0,079	0	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,086	0,077	0	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,086	0,080	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,086	0,079	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,084	0,077	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,084	0,080	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,156	0,136	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,151	0,144	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,154	0,174	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,175	0,136	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,179	0,144	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,182	0,174	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,172	0,136	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,157	0,144	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,176	0,174	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,155	0,146	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,153	0,142	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,154	0,131	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,184	0,146	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,189	0,142	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,177	0,131	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,170	0,146	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,162	0,142	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,164	0,131	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,157	0,145	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,153	0,143	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,154	0,130	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,177	0,145	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,190	0,143	3	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,190	0,130	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,171	0,145	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,167	0,143	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,165	0,130	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,354	0,475	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,404	0,480	6	1

BAL	Patógeno	pH	REP	Absob	controle	t	Estado
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,419	0,444	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,476	0,475	6	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,457	0,480	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,485	0,444	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,389	0,475	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,443	0,480	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,487	0,444	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,324	0,473	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,458	0,481	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,386	0,452	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,435	0,473	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,431	0,481	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,454	0,452	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,366	0,473	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,366	0,481	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,490	0,452	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,314	0,483	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,328	0,484	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,337	0,460	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,418	0,483	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,375	0,484	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,436	0,460	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,375	0,483	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,421	0,484	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,458	0,460	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,957	0,671	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	1,092	0,651	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	1,274	0,620	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	1,191	0,671	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	1,568	0,651	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	1,274	0,620	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	1,585	0,671	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	1,369	0,651	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	1,493	0,620	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,939	0,669	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	1,030	0,650	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,998	0,620	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	1,152	0,669	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	1,374	0,650	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	1,374	0,620	24	0

BAL	Patógeno	pH	REP	Absob	controle	t	Estado
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	1,313	0,669	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	1,217	0,650	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	1,450	0,620	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,933	0,671	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,934	0,652	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,986	0,623	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	0,991	0,671	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	1,279	0,652	24	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,959	0,623	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	1	1,261	0,671	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	2	0,947	0,652	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	6,0	3	0,998	0,623	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,084	0,079	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,082	0,081	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,084	0,079	0	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,085	0,079	0	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,083	0,081	0	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,083	0,079	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,084	0,079	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,084	0,081	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,083	0,079	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,148	0,134	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,147	0,143	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,155	0,145	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,162	0,134	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,171	0,143	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,172	0,145	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,163	0,134	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,167	0,143	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,184	0,145	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,151	0,135	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,151	0,144	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,161	0,146	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,166	0,135	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,180	0,144	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,181	0,146	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,169	0,135	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,173	0,144	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,201	0,146	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,152	0,135	3	0

BAL	Patógeno	pH	REP	Absob	controle	t	Estado
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,154	0,145	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,164	0,146	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,170	0,135	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,187	0,145	3	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,189	0,146	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,174	0,135	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,177	0,145	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,210	0,146	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,310	0,349	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,318	0,359	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,354	0,379	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,351	0,349	6	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,378	0,359	6	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,367	0,379	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,329	0,349	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,353	0,359	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,399	0,379	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,319	0,343	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,326	0,365	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,368	0,385	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,332	0,343	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,349	0,365	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,362	0,385	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,328	0,343	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,334	0,365	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,366	0,385	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,323	0,345	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,331	0,372	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,377	0,385	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,328	0,345	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,345	0,372	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,361	0,385	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	0,316	0,345	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,324	0,372	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,356	0,385	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,130	0,802	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	0,989	0,837	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	1,103	0,749	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,187	0,802	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,308	0,837	24	0

BAL	Patógeno	pH	REP	Absob	controle	t	Estado
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	1,103	0,749	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,068	0,802	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,046	0,837	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,953	0,749	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,061	0,806	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,002	0,835	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	1,103	0,759	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,211	0,806	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,377	0,835	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	1,109	0,759	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,082	0,806	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,050	0,835	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,966	0,759	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,043	0,785	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,006	0,821	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	1,104	0,750	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,252	0,785	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,372	0,821	24	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	1,117	0,750	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	1	1,100	0,785	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	2	1,053	0,821	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	6,0	3	0,977	0,750	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,080	0,076	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,083	0,074	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,084	0,076	0	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,085	0,076	0	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,083	0,074	0	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,084	0,076	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,082	0,076	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,082	0,074	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,083	0,076	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,094	0,085	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,096	0,085	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,097	0,085	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,103	0,085	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,101	0,085	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,097	0,085	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,095	0,085	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,098	0,085	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,097	0,085	3	0

BAL	Patógeno	pH	REP	Absob	controle	t	Estado
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,095	0,086	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,097	0,088	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,098	0,086	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,110	0,086	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,108	0,088	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,096	0,086	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,095	0,086	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,099	0,088	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,098	0,086	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,095	0,086	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,096	0,090	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,096	0,085	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,113	0,086	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,112	0,090	3	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,094	0,085	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,092	0,086	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,099	0,090	3	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,097	0,085	3	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,310	0,241	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,308	0,295	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,327	0,222	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,381	0,241	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,390	0,295	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,319	0,222	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,342	0,241	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,351	0,295	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,349	0,222	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,324	0,253	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,314	0,309	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,324	0,234	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,428	0,253	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,453	0,309	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,313	0,234	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,334	0,253	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,372	0,309	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,363	0,234	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,319	0,257	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,306	0,319	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,300	0,236	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,467	0,257	6	0

BAL	Patógeno	pH	REP	Absob	controle	t	Estado
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,489	0,319	6	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,288	0,236	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,304	0,257	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,384	0,319	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,356	0,236	6	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,676	0,637	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,728	0,655	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,847	0,628	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,703	0,637	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,719	0,655	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,697	0,628	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,679	0,637	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,732	0,655	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,709	0,628	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,676	0,632	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,693	0,654	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,721	0,627	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,650	0,632	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,657	0,654	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,737	0,627	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,679	0,632	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,737	0,654	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,779	0,627	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,677	0,638	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,676	0,654	24	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,747	0,628	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,672	0,638	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,696	0,654	24	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,764	0,628	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	1	0,698	0,638	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	2	0,749	0,654	24	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	6,0	3	0,784	0,628	24	0



ANEXO B – Valores de absorvância para a amostra Tal Qual.

### Valores de absorvância para a amostra Tal Qual.

BAL	Patógeno	pH	REP	Absorb	Controle	t	Estado
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,079	0,078	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,080	0,078	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,080	0,079	0	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,083	0,078	0	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,083	0,078	0	0
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,083	0,079	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,083	0,078	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,083	0,078	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,083	0,079	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,173	0,281	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,173	0,287	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,179	0,280	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,223	0,281	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,225	0,287	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,226	0,280	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,218	0,281	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,219	0,287	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,225	0,280	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,089	0,145	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,088	0,156	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,089	0,165	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,112	0,145	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,114	0,156	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,115	0,165	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,106	0,145	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,107	0,156	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,105	0,165	3	1

BAL	Patógeno	pH	REP	Absorb	Controle	t	Estado
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,083	0,116	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,083	0,111	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,083	0,112	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,086	0,116	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,088	0,111	3	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,090	0,112	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,084	0,116	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,087	0,111	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,085	0,112	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,083	0,114	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,082	0,115	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,083	0,112	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,085	0,114	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,085	0,115	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,086	0,112	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,082	0,114	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,085	0,115	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,084	0,112	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,103	0,322	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,102	0,307	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,105	0,495	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,149	0,322	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,148	0,307	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,148	0,495	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,143	0,322	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,143	0,307	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,145	0,495	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,081	0,239	6	1

<b>BAL</b>	<b>Patógeno</b>	<b>pH</b>	<b>REP</b>	<b>Absorb</b>	<b>Controle</b>	<b>t</b>	<b>Estado</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,082	0,235	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,083	0,240	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,087	0,239	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,088	0,235	6	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,089	0,240	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,083	0,239	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,086	0,235	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,087	0,240	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,081	0,236	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,082	0,226	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,083	0,399	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,084	0,236	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,085	0,226	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,086	0,399	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,082	0,236	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,085	0,226	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,084	0,399	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,221	0,498	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,223	0,526	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,228	0,513	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,277	0,498	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,278	0,526	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,277	0,513	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,272	0,498	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,275	0,526	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,276	0,513	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,140	0,350	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,141	0,350	24	1

<b>BAL</b>	<b>Patógeno</b>	<b>pH</b>	<b>REP</b>	<b>Absorb</b>	<b>Controle</b>	<b>t</b>	<b>Estado</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,145	0,407	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,188	0,350	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,189	0,350	24	1
<i>L. sake</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,187	0,407	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	1	0,186	0,350	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	2	0,189	0,350	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>E. coli</i>	5,5	3	0,189	0,407	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,080	0,077	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,080	0,077	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,079	0,077	0	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,081	0,077	0	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,081	0,077	0	0
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,081	0,077	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,081	0,077	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,081	0,077	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,080	0,077	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,180	0,298	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,185	0,300	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,187	0,312	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,220	0,298	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,218	0,300	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,215	0,312	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,221	0,298	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,225	0,300	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,226	0,312	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,087	0,173	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,090	0,177	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,090	0,190	3	1

<b>BAL</b>	<b>Patógeno</b>	<b>pH</b>	<b>REP</b>	<b>Absorb</b>	<b>Controle</b>	<b>t</b>	<b>Estado</b>
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,110	0,173	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,108	0,177	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,106	0,190	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,104	0,173	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,106	0,177	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,107	0,190	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,081	0,147	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,082	0,152	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,080	0,166	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,086	0,147	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,087	0,152	3	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,084	0,166	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,083	0,147	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,083	0,152	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,082	0,166	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,079	0,147	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,081	0,153	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,079	0,168	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,083	0,147	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,083	0,153	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,081	0,168	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,082	0,147	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,153	0,153	6	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,080	0,168	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,106	0,450	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,109	0,462	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,111	0,492	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,145	0,450	6	1

<b>BAL</b>	<b>Patógeno</b>	<b>pH</b>	<b>REP</b>	<b>Absorb</b>	<b>Controle</b>	<b>t</b>	<b>Estado</b>
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,141	0,462	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,138	0,492	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,146	0,450	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,149	0,462	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,150	0,492	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,081	0,389	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,081	0,406	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,081	0,438	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,089	0,389	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,086	0,406	6	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,085	0,438	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,083	0,389	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,083	0,406	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,083	0,438	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,080	0,391	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,080	0,408	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,080	0,439	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,085	0,391	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,083	0,408	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,082	0,439	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,082	0,391	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,076	0,408	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,081	0,439	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,232	0,916	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,234	0,915	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,238	0,946	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,273	0,916	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,271	0,915	24	1

<b>BAL</b>	<b>Patógeno</b>	<b>pH</b>	<b>REP</b>	<b>Absorb</b>	<b>Controle</b>	<b>t</b>	<b>Estado</b>
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,269	0,946	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,277	0,916	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,278	0,915	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,280	0,946	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,147	0,795	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,148	0,773	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,152	0,822	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,185	0,795	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,181	0,773	24	1
<i>L. sake</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,179	0,822	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	1	0,190	0,795	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	2	0,191	0,773	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	5,5	3	0,194	0,822	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,078	0,074	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,078	0,075	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,079	0,079	0	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,080	0,074	0	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,082	0,075	0	0
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,081	0,079	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,080	0,074	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,080	0,075	0	0
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,080	0,079	0	0
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,196	0,237	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,199	0,237	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,201	0,241	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,206	0,237	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,203	0,237	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,202	0,241	3	1



BAL	Patógeno	pH	REP	Absorb	Controle	t	Estado
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,234	0,237	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,236	0,237	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,236	0,241	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,095	0,115	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,097	0,118	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,098	0,123	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,100	0,115	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,098	0,118	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,099	0,123	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,113	0,115	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,114	0,118	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,115	0,123	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,081	0,087	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,082	0,090	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,082	0,092	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,082	0,087	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,082	0,090	3	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,083	0,092	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,083	0,087	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,083	0,090	3	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,082	0,092	3	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,078	0,087	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,079	0,089	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,079	0,091	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,081	0,087	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,080	0,089	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,081	0,091	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,081	0,087	6	1

BAL	Patógeno	pH	REP	Absorb	Controle	t	Estado
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,080	0,089	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,080	0,091	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,118	0,307	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,122	0,327	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,124	0,286	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,128	0,307	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,125	0,327	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,125	0,286	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,158	0,307	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,161	0,327	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,160	0,286	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,080	0,256	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,082	0,283	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,081	0,237	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,082	0,256	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,081	0,283	6	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,083	0,237	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,083	0,256	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,080	0,283	6	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,084	0,237	6	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,078	0,259	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,080	0,285	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,079	0,241	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,082	0,259	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,081	0,285	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,082	0,241	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,081	0,259	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,082	0,285	24	1

BAL	Patógeno	pH	REP	Absorb	Controle	t	Estado
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,082	0,241	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,247	0,818	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,250	0,834	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,251	0,811	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,259	0,818	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,255	0,834	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,254	0,811	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,285	0,818	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,291	0,834	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,285	0,811	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,159	0,202	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,162	0,209	24	1
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,163	0,205	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,170	0,202	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,167	0,209	24	1
<i>L. sake</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,165	0,205	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	1	0,170	0,202	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	2	0,167	0,209	24	1
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5,5	3	0,165	0,205	24	1