



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LARISSA DE ALMEIDA SOARES

**CINÉTICA DO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO
EXTRATO DE CASCAS E SEMENTES DE
TAMARINDO**

São Cristóvão SE

Janeiro de 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LARISSA DE ALMEIDA SOARES

**CINÉTICA DO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO
EXTRATO DE CASCAS E SEMENTES DE
TAMARINDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr^a. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana.
Agência Financiadora: Capes

São Cristóvão- SE

Janeiro de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S676c Soares, Larissa de Almeida
Cinética do crescimento *in vitro* de bactérias em meio de cultivo contendo extrato de cascas e sementes de tamarindo / Larissa de Almeida Soares ; orientadora Luciana Cristina Lins de Aquino Santana. – São Cristóvão, 2020.
64 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Tamarindo. 3. Microbiologia. 4. Bactérias patogênicas. I. Santana, Luciana Cristina Lins de Aquino, orient. II. Título.

CDU 664:634.46

LARISSA DE ALMEIDA SOARES

**CINÉTICA DO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO
EXTRATO DE CASCAS E SEMENTES DE
TAMARINDO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de
Alimentos como requisito
parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Drª. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana.
Orientador/ PROCTA - UFS



Prof.ª. Dr. Gabriel Isaías Lee Tuñon
Examinador Externo/ Departamento de Medicina Veterinária -UFS



Profª Dr. Maria Aparecida Azevedo da Silva
Examinador Interno/ PROCTA - UFS

São Cristóvão- SE

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por preparar planos maiores que os meus, por me guiar e me ajudar a seguir em frente, sem desanimar em meio as dificuldades.

Agradeço aos meus familiares, principalmente aos meus pais, por todo apoio e amor, e por motivarem e me mostrar o quanto é importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade. E, a minha irmã, Vanessa, pelas palavras de sabedoria, amor e apoio.

À minha orientadora Dr^a. Luciana Aquino por seus valiosos ensinamentos, conselhos, disponibilidade, paciência e apoio ao longo desta jornada. Aqui lhe exprimo a minha imensa gratidão.

Também agradeço aos professores de disciplinas que tive durante esse mestrado, principalmente a professora Dr^a. Maria Aparecida e a professora Dr^a. Patrícia Beltrão, as quais me passaram conhecimentos que me ajudaram a crescer durante o curso e que tanto inspiraram.

Aos amigos que fiz em Sergipe, e que me acolheram tão bem. Em especial a Alexandre, Larissa, Fernando e Herácles que tanto me apoiaram, se preocuparam e vibraram comigo minhas conquistas e que foram família nesses dois anos.

Aos meus amigos em Guanambi que sempre se fizeram presentes e preocupados.

Aos meus colegas de graduação, Adeuvânia e Luan, por todo apoio e amizade. E à minha primeira orientadora, Aureluci Aquino, por me ensinar as premissas básicas de microbiologia, vida e profissionalismo. E, por toda presença, incentivo e carinho.

Aos meus tios e segunda família, Elena e Osmar, por todo sustento em oração, presença constante e amor.

Aos meus colegas de laboratório, pelo apoio, incentivo, descontração e sugestões durante a pesquisa. Em especial à Tacila por todo carinho e paz que transmite. À Grazi, minha companheira fiel, a quem agradeço a Deus por sua vida e pelo infinito cuidado, preocupação e amizade. Obrigada pela leveza que você trouxe quando tudo pareceu pesado demais.

Agradeço a Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de realização deste curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

E a todas as pessoas que contribuíram com essa dissertação de forma direta e indiretamente, o meu MUITO OBRIGADA.

SOARES, L. A. Cinética do crescimento *in vitro* de bactérias em meio de cultivo contendo extrato de cascas e sementes de tamarindo [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe; 2020.

RESUMO

A microbiologia preditiva tem sido aplicada, através de modelos matemáticos, com o intuito de prever o comportamento de microrganismos quando expostos às condições de crescimento variadas. Esta ciência tem ganhado destaque visto que permite prever taxas de crescimento e duração da fase lag de microrganismos patogênicos contaminantes de alimentos. Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar o efeito da temperatura (10 a 45°C), pH (5,0 a 9,0), concentração de cloreto de sódio (0 a 8,5%) e concentração de extrato de casca e de semente de tamarindo em etanol 80% (0 a 10%) no crescimento *in vitro* de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* e *Enterococcus faecalis*. Os parâmetros foram avaliados segundo planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais. As bactérias foram incubadas nas condições propostas e o modelo primário de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados experimentais (coeficientes de correlação entre 0,72 e 1) obtendo-se as taxas de crescimento e o tempo da fase lag. Em geral, houve a inibição do crescimento para todas as bactérias obtendo-se taxas que variaram entre -0,03 e -6,04 Log UFC/mL h. Através das análises do gráfico de Pareto verificou-se que o pH foi o parâmetro que mais apresentou efeito significativo. No entanto, os extratos de casca e semente de tamarindo também apresentaram significância nas inibições. Neste estudo realizou-se a predição do crescimento *in vitro* de bactérias patogênicas em meio de cultivo contendo extrato de resíduo de tamarindo, tendo este demonstrado um fraco potencial para ser utilizado como antimicrobiano natural.

Palavras-chave: Microbiologia preditiva, bactérias patogênicas, antimicrobiano, tamarindo.

SOARES, L. A. Kinetics of *in vitro* growth of bacteria in cultivation containing tamarindo shells and seeds extract [Dissertation]. São Cristóvão: Program Postgraduate Food Science and Technology, Federal University of Sergipe; 2020.

ABSTRACT

Predictive microbiology has been applied, through mathematical models, in order to predict the behavior of microorganisms when exposed to varied growth conditions. This science has gained prominence since it allows to predict growth rates and lag phase duration of contaminating pathogenic microorganisms in food. In this context, this work aimed to evaluate the effect of temperature (10 to 45 ° C), pH (5.0 to 9.0), sodium chloride concentration (0 to 8.5%) and concentration of bark extract and of tamarind seed in 80% ethanol (0 to 10%) in the *in vitro* growth of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis and *Enterococcus faecalis*. The parameters were evaluated according to fractional factorial design 2^{4-1} plus 3 central points. The bacteria were incubated under the proposed conditions and the primary model of Baranyi and Roberts was adjusted to the experimental data (correlation coefficients between 0.72 and 1) to obtain the growth rates and the lag phase time. In general, there was growth inhibition for all bacteria, with rates ranging from -0.03 to -6.04 Log UFC / mL h. Through the analysis of the Pareto graph it was found that pH was the parameter that had the most significant effect. However, the extracts of bark and tamarind seed also showed significance in the inhibitions. In this study, the *in vitro* growth of pathogenic bacteria was predicted in a culture medium containing extract of tamarind residue, which showed a weak potential to be used as a natural antimicrobial.

Key-words: Predictive microbiology, pathogenic bacteria, antimicrobial, tamarind.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crescimento microbiano de parâmetros utilizados no modelo de Baranyi e Roberts (1994). 16

Figura 2. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *B. subtilis* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0). 30

Figura 3. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *E. faecallis* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0). 31

Figura 4. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *P. aeruginosa* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0). 32

Figura 5. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. aureus* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0). 33

Figura 6. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. enteritidis* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH

7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0).**Erro! Indicador não definido.**4

Figura 7. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *B. subtilis* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0).**Erro! Indicador não definido.**9

Figura 8. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *E. faecalis* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0). 40

Figura 9. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *P. aeruginosa* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0). 41

Figura 10. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. aureus* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0). 42

Figura 11. Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. enteritidis* nas seguintes condições: (A) Experimentos 2 (45°C, pH 5,0) e 6 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl); (B) Experimentos 8 (45°C, pH 5,0, 8,5% de NaCl, 10% extrato) e 9 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (C) Experimentos 10 (28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato) e 11(28°C, pH 7,0, 4,3% de NaCl, 5% extrato); (D) Experimento 4 (45°C, pH 9,0).**Erro! Indicador não definido.**3

Figura 12. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo frente a velocidade de crescimento de (A) *Bacillus subtilis*, (B) *Pseudomonas aeruginosa*, (C) *Enterococcus faecalis* 445

Figura 13. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo frente a velocidade de crescimento de (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Salmonella enteritidis*..... 46

Figura 14. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de semente de tamarindo frente ao (A) *Bacillus subtilis*, (B) *Pseudomonas aeruginosa*..... 477

Figura 15. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de semente de tamarindo frente ao (C) *Enterococcus faecalis*, (D) *Staphylococcus aureus*, (E) *Salmonella enteritidis*..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis reais e codificadas do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais	23
Tabela 2. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.	26
Continuação da Tabela 2. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.	27
Tabela 3. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.	36
Continuação da tabela 3. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivo específicos.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1	Importância da microbiologia preditiva na segurança alimentar	13
3.2	Microbiologia preditiva: Definições	14
3.3	Estudos realizados com microbiologia preditiva	17
3.4	Compostos bioativos em resíduos de tamarindo	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Materiais	21
4.2	Bactérias	21
4.3	Obtenção e tratamento dos resíduos de tamarindo.....	21
4.4	Obtenção dos extratos.....	21
4.5	Preparo das suspensões bacterianas	22
4.6	Crescimento de bactérias patogênicas em diferentes condições de cultivo.....	22
4.7	Obtenção dos parâmetros de crescimento microbiano	23
4.8	Efeito dos parâmetros na velocidade de crescimento das bactérias	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Avaliação do crescimento bacteriano em meio de cultivo contendo extrato de cascas de tamarindo	24
5.2	Avaliação do crescimento bacteriano em meio de cultivo contendo extrato de sementes de tamarindo	29
5.3	Influência dos parâmetros no crescimento das bactérias patogênicas	44
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

O controle de bactérias patogênicas continua sendo um desafio para a indústria de alimentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), a contaminação de alimentos seja de ordem química, física ou microbiológica pode gerar mais de 200 tipos de doenças. A estimativa é que após a ingestão de algum alimento contaminado 1 a cada 10 pessoas apresente algum quadro de patologia e que por ano uma média de 420.000 pessoas apresentem quadro de óbito por ingestão de alimentos contaminados. O que torna as doenças transmitidas por alimentos uma questão preocupante em nível de saúde pública mundial (XIE *et al.*, 2019).

De modo a garantir a segurança alimentar, profissionais do segmento industrial, empresas de consultoria e institutos voltados à pesquisa têm apostado na modelagem preditiva e quantificação de risco microbiano (RODRÍGUEZ *et al.*, 2018).

A modelagem preditiva relaciona as taxas de crescimento, sobrevivência e morte aos fatores ambientais que os microrganismos são expostos, os fatores estudados mais comuns são: temperatura, pH, atividade de água, conservantes (STRINGER; METRIS, 2017). O comportamento de patógenos frente a esses fatores pode ser estudado com o auxílio de programas preditivos como o “USDA Pathogen Modeling Program (PMP)” e “ComBase Predictor” (JUNEKA *et al.*, 2018).

Segundo Rodríguez *et al.* (2018), os modelos matemáticos aplicados, disponíveis são altamente confiáveis para determinação de qualidade e segurança de produtos alimentícios. Teleken *et al.* (2018) afirmam que, os modelos tornam possível, por exemplo, o conhecimento do crescimento de bactérias durante a mudança de temperatura em diferentes etapas do processamento. Ainda para estes autores, modelos que abrangem a temperatura como um parâmetro pode ser uma ferramenta eficaz para prever prazos de validade de um produto, além de determinar a patogenicidade ou deterioração de um risco.

Ao longos anos vários pesquisadores têm utilizado a microbiologia preditiva para avaliar o comportamento de bactérias patogênicas como *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Aeromonas*, bactérias ácidos lácticas e *Enterobacteriaceae* frente à parâmetros tais como: pH, temperatura, atividade de água, ácido acético, ácido propiônico, cloreto de sódio, dióxido de carbono, dentre outros (AKKERMANS *et al.*, 2018; COUVERT *et al.*, 2017; NYHAN *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2017; HOEL *et al.*, 2018; ILIADIS *et al.*, 2018;).

Nos estudos sobre o efeito de extratos de plantas, Krishnan *et al.* (2015) avaliaram o efeito de extratos de cravo da índia, canela e orégano no crescimento de bactérias ácidos lácticas

e *Enterobacteriaceae* nas temperaturas 4, 10, 15 e 20°C e Kavuncuoglu *et al.* (2018) realizaram estudo preditivo do efeito inibitório de extrato de noz frente às bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacea*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*. Trabalhos prévios tem demonstrado o potencial de extratos da casca e sementes de tamarindo em solvente etanol para a inibição das bactérias *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis (SANTOS; SANTANA, 2017). Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar o efeito do pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio e concentrações dos extratos em etanol 80% das farinhas de casca e de sementes de tamarindo no crescimento *in vitro* de bactérias patogênicas

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da microbiologia preditiva na segurança alimentar

Segundo o “Codex Alimentarius” (2007), a gestão de risco microbiológico é uma ferramenta aplicada como forma de controle de toda a cadeia produtiva, visando a garantia da segurança alimentar em indústrias de alimentos e deve abranger o crescimento, sobrevivência e inativação de microrganismos.

Assim, a microbiologia preditiva surge como sendo mais eficaz na predição do crescimento bacteriano, segundo Messens *et al.* (2018) os modelos preditivos envolvidos são caracterizados como essenciais ao processo de avaliação de risco, já que estes fornecem informações relevantes tanto para a área acadêmica quanto para setores industriais.

Modelos aplicados em sistemas que simulam as condições de matrizes alimentares ajudam no entendimento de como microrganismo reagem a condições específicas (BOLÍVAR *et al.*, 2019). Para Tamplin *et al.* (2018), os modelos permitem, a partir do conhecimento da cinética de crescimento ou probabilidade de crescimento/inativação do microrganismo, o conhecimento do comportamento microbiano que pode ser estudado frente a diferentes condições (temperatura, pH, atividade de água), resultando o comportamento em equações que irão descrever esse comportamento.

O conhecimento de como os microrganismos se comportam em condições ambientais permite que a microbiologia preditiva seja aplicada em várias áreas, como análise e pontos críticos de controle (HACCP), avaliação do prazo de validade, conformidade aos critérios microbiológicos, plano de amostragem, exposição do produto e na parte experimental, tendo como vantagem o curto tempo que permite a tomada de decisões em tempo real (MESSENS *et al.*, 2018).

Por se tornar uma ferramenta eficiente, a tendência é que novos modelos sejam validados e conseguindo abranger outros parâmetros. Rodríguez *et al.* (2018) afirmam que a microbiologia terá ainda mais significância para segurança alimentar, devido a possibilidade de criação de novos modelos que caracterizem de forma rápida o crescimento microbiano e os fatores ambientais, os autores ainda citam uma nova tendência na microbiologia preditiva, como novo parâmetro surgem as características estruturais da matriz alimentar testada. Neste contexto, a microbiologia preditiva surge na segurança alimentar como fonte de confiança em relação à qualidade microbiológica de produtos, devido a confiabilidade da validação dos modelos, com auxílio de softwares (RODRÍGUEZ *et al.*, 2018).

2.2 Microbiologia preditiva: Definições

Quando microrganismos são expostos a um ambiente sob condições favoráveis e semelhantes à sua especificidade, apresentam crescimento em diferentes fases (lag, exponencial e estacionária). Porém, quando presente em condições adversas, a população decresce gradualmente (HUANG, 2017). Nesse contexto, a microbiologia preditiva surge como um estudo quantitativo que prediz sobrevivência e crescimento de microrganismos em determinadas condições de ambiente, incluindo a aplicação de modelos matemáticos a fim de se prever as melhores condições de crescimento (GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Dentre as fases de crescimento microbiano, tem-se atenção voltada à fase lag, na microbiologia preditiva, uma vez que nesta fase ocorre a adaptação dos microrganismos ao ambiente com as condições estudadas, como exemplo pH e temperatura, e assim é possível determinar as melhores condições para ser mantida a qualidade dos produtos durante a vida de prateleira. Através da microbiologia preditiva é possível estudar os efeitos das condições ambientais no crescimento de microrganismos, com o intuito de mantê-los o máximo de tempo na fase lag (VERCAMMEN *et al.*, 2017).

Voltando o estudo para aplicação prática, o conhecimento da fase lag é imprescindível visto que este permite estimar e prever o tempo necessário que uma célula bacteriana necessita para se multiplicar para uma concentração acima de um limite tolerável (AGUIRRE *et al.*, 2011). Para Vercammen *et al.* (2017) a fase lag é de suma importância na microbiologia preditiva, uma vez que é comum mudanças ambientais frequentes durante as etapas de produção, distribuição e armazenamento de alimentos, desta forma o conhecimento da fase lag assegurará a qualidade e segurança do alimento produzido, isto é conseguido porque as propriedades organolépticas dos alimentos não são alteradas já que o número de microrganismos permanecem constantes (TARLAK *et al.*, 2018).

Whiting e Buchanan (1993) concluíram que a microbiologia preditiva segue três passos. O primeiro está relacionado à obtenção de um número suficiente de curvas de crescimento em diferentes condições, onde cada curva é ajustada em um modelo adequado para determinar a influência de parâmetros pertinentes. O segundo passo relata a obtenção de um modelo secundário que realiza a análise dos efeitos estudados nos parâmetros cinéticos dos modelos primários, e tem por finalidade resolver problemas inversos. Quando obtidos os modelos primários e secundários é feita uma planilha, com ajuda de softwares, para prever o comportamento dos microrganismos frente as condições propostas. O terceiro, e último, passo é usado para previsões futuras.

Para Tarlak *et al.* (2018) modelos primários são utilizados para descrever o crescimento de microrganismos quando expostos a determinada condição em função do tempo de exposição. González *et al.* (2019) descrevem a modelagem primária como sendo uma função que é gerada a partir de dados obtidos de observações diretas da morte microbiana, cinética de crescimento e relação dose-resposta. Huang (2017) descreve o modelo primário como o modelo principal para descrição na mudança de crescimento e concentração de microrganismos sob condições em função do tempo. Ainda segundo este autor, a partir da análise dos dados, estes modelos estimam a taxa de crescimento microbiano em uma curva de crescimento e o tempo de redução decimal (valor D) em uma curva de sobrevivência, onde geralmente a variável dependente é a concentração do microrganismo estudado e as variáveis independentes os parâmetros testados (HABERBECK *et al.*, 2018).

Para construção do modelo faz-se necessário obter quantidade suficiente de curvas de crescimento em condições distintas a serem testadas. Assim, cada curva será analisada utilizando um modelo primário adequado para que sejam descritas a cinética (HUANG, 2017). Dentre os modelos mais utilizados, pode-se citar os modelos Gompertz modificados, logísticos e Baranyi e Roberts (TARLAK *et al.*, 2018).

Dentre os modelos citados anteriormente, tem-se destaque para o último, sendo amplamente utilizado para prever o crescimento de microrganismos, visto que este inclui a fase exponencial e lag determinados por função ajuste (BARANYI; ROBERTS, 1994). A fórmula deste modelo segue abaixo na Equação 1. O modelo primário pode ser feito a partir do software DMFit, que irá gerar curvas a partir de dados de crescimento em diferentes condições e assim a cinética será traduzida no modelo secundário que descreve mudanças na taxa de crescimento frente a condição estudada (TAMPLIN *et al.*, 2018).

Equação 1. Modelo de Baranyi e Roberts

$$y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{m\acute{a}x} A(t)} - 1}{e^{m(y_{m\acute{a}x} - y_0)}} \right)$$

Onde:

$y(t)$: população microbiana no tempo t [$\log(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$];

y_0 : população microbiana inicial no tempo t_0 [$\log(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$];

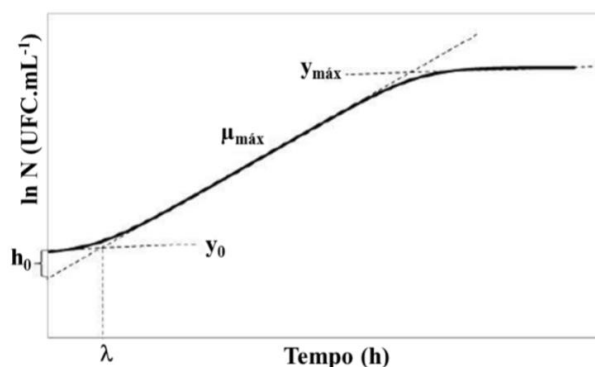
$\mu_{m\acute{a}x}$: taxa de crescimento máxima [$\log(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$];

m : parâmetro relacionado à curvatura depois da fase exponencial;

$y_{m\acute{a}x}$: população microbiana máxima [$\log(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$].

As definições de y_0 (população microbiana inicial em t_0), $\mu_{\max}$ (taxa de crescimento máxima), $y_{\max}$ (população microbiana máxima) descritas acima podem ser visualizadas na Figura 1:

Figura 1. Curva de crescimento microbiano de parâmetros utilizados no modelo de Baranyi e Roberts (1994).



Fonte: Singh, 2010.

Segundo González *et al* (2019), os modelos de segundo nível ou secundários permitem a construção de funções no qual relaciona-se os dados da modelagem primária com variáveis complacentes ao microrganismo (estresse, tensão, estado fisiológico) ou ao ambiente em que este está exposto. Sendo assim, a modelagem secundária surge como uma ferramenta para expor o efeito das condições estudadas no modelo primário (HUANG, 2017), dentro destas condições podem ser citadas a temperatura, pH e atividade de água, sendo a temperatura a condição de maior relevância para o estudo de sobrevivência de microrganismos (TARLAK *et al*, 2018).

A partir de dados do modelo primário, este segundo modelo avalia as mudanças na cinética de crescimento, a partir de parâmetros sejam ele intrínsecos ou extrínsecos (POSSAS *et al.*, 2017), podendo ser descrita por três tipos de modelo: modelo de raiz quadrada, relações de Arrhenius e superfície de resposta (FORSYTHE, 2007).

Partindo das funções obtidas na modelagem primária e secundária, obtêm-se os modelos terciários, que tem como objetivo incorporar os dois modelos anteriores em softwares (POSSAS *et al.*, 2017), de modo que possam ser obtidos respostas dos efeitos das diferentes condições estudadas (FORSYTHE, 2007). Estes modelos podem ser classificados em três elementos: matemático, previsão e aplicabilidade.

O matemático permite identificar as variáveis independentes e como estas influenciarão na variável resposta, pode ser utilizada nesse caso a análise de regressão. A

previsão, também conhecida como validação, estuda como o modelo desenvolvido se comportará em matrizes alimentares diferentes do qual foi desenvolvido. Sendo os dois modelos anteriores desenvolvidos e aplicados na área científica, enquanto o último elemento, de aplicação, torna-se crucial para a área operacional (GONZÁLEZ *et al.*, 2019).

Para a construção dos modelos terciários pode ser utilizado softwares, tais como: Excel, calculadora de letalidade de processos (<http://www.amif.org/>), ComBase Predictor (http://browser.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx?model¼1) e o USDA Pathogen Modeling Program (<https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx>) (TAMPLIN *et al.*, 2018).

2.3 Estudos realizados com microbiologia preditiva

Considerando que o crescimento de bactérias está condicionado a uma série de fatores, vários pesquisadores têm utilizado a microbiologia preditiva para avaliar o efeito de diversos parâmetros no crescimento bacteriano. Nyhan *et al.* (2018) ao modelarem *in vitro*, em caldo de abóbora e em molho o crescimento da *Listeria* estudaram o efeito das concentrações de pH (4,7, 5,0 e 5,3), atividade de água (0,93, 0,96 e 0,98), ácido acético (0, 1 e 2 mM) e ácido propiônico (0, 1 e 2), com auxílio do software ComBase Predictor. Os autores concluíram que nas matrizes alimentares estudadas o modelo superestimou o crescimento da *Listeria* quando comparado ao estudo realizado *in vitro*.

Gonçalves *et al.* (2017) utilizaram os modelos de Baranyi e Roberts e o de Gompertz para prever o crescimento da *Pseudomonas fluorescens* em caldo de carne sob faixas de pH 5,5, 6,0 e 6,3 e temperatura de 4, 7 e 12° C, tendo o primeiro modelo apresentado melhor ajuste, e em sequência utilizaram o modelo de Ratkowsky para prever o efeito do pH e temperatura no crescimento da *Pseudomonas*. E, para o ajuste foi utilizado o programa DMFit 3.0. Os autores concluíram que os modelos testados podem ser aplicados na predição do crescimento da bactéria estudada devido ao bom ajuste dos dados ao modelo.

Hoel *et al.* (2018) avaliando a cinética de crescimento de onze cepas de *Aeromonas* em sushi nigiri variando a temperatura (4° a 8°C) e pH (3,5 a 10) através do modelo de Baranyi e Roberts), com auxílio do software ComBase Predictor, concluíram que o modelo não previu suficientemente o crescimento de apenas uma cepa (*A. hydrophila*) sob as condições testadas. Contudo, as demais cepas obtiveram bons ajustes ao modelo.

Iliadis *et al.* (2018) estudaram o efeito combinado da temperatura (13 a 39°C), pH (5 a 8) e cloreto de sódio (0,5 a 8,5%) na formação de biofilme de três cepas de *Salmonella*: *Salmonella entérica*, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella typhimurium*. A metodologia de

superfície foi utilizada para modelar o efeito combinado de cada fator na resposta, analisando três fatores independentes. Por fim, os autores concluíram que os modelos previram o efeito combinado da temperatura, pH e NaCl na redução do biofilme.

Na literatura ainda são escassos os trabalhos com modelos preditivos que citam a utilização de extratos com potencial antimicrobiano. Krishnan *et al.* (2015) avaliaram o efeito de extratos de cravo da Índia, canela e orégano no crescimento de bactérias ácidos lácticos e *Enterobacteriaceae* nas temperaturas 4, 10, 15 e 20°C, obtendo-se bons ajustes pelo modelo de Gompertz. Kavuncuoglu *et al.* (2018) utilizaram modelo matemático para prever o efeito de inibição de extrato de noz frente às bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*, variando a concentração bacteriana e o tipo de extração. Os autores concluíram que os dados experimentais obtiveram boa correlação com os valores previstos pela equação.

Partindo da potencialidade de utilização de extratos com efeito antimicrobiano na modelagem preditiva e a partir de estudos prévios do nosso grupo de pesquisa tem-se verificado que extratos em solvente etanol da casca, sementes e junção de cascas e sementes de tamarindo apresentaram potencial antimicrobiano contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Enteritidis e *Bacillus subtilis* (SANTOS; SANTANA, 2017).

2.4 Compostos bioativos em resíduos de tamarindo

O tamarindo (*Tamarindus indica* L.) pertence à família das leguminosas *caesalpinaceae* e consegue se desenvolver em condições extremamente secas (GHAFFARIPOUR, 2017). É comumente encontrado em países asiáticos como a Índia, Bangladesh, Sri Lanka, Tailândia e Indonésia, e nos continentes africano (PAULA *et al.*, 2009), mas também pode ser encontrado na América do Norte e América do Sul (TRILL *et al.*, 2014). A árvore tem em média 24 metros de altura (KURU, 2014). Seus frutos são revestidos por uma casca dura e de extremidades arredondadas e contém de 3 a 8 sementes, que costumam ser descartados na indústria de processamento (SOUZA *et al.*, 2018). A casca descartada costuma ser considerada como um bioresíduo por ser um material orgânico (RANGARAJ *et al.*, 2019). As sementes ricas em amido, são obtidas em grande quantidade nas indústrias de polpa e

utilizadas como agro resíduo (MOHAN *et al.*, 2018), e têm demonstrado potencial de aplicação nas indústrias de goma (HUANBUTTA *et al.*, 2019).

Apesar de serem descartados pela indústria de processamento, cascas e sementes de tamarindo apresentam compostos bioativos com potencial antimicrobiano e antioxidante (GANESAPILLAI *et al.*, 2017). Luzia e Jorge (2011) determinaram 49,3 mg ácido gálico/g em sementes de tamarindo. Olagunju *et al.* (2018) citam a presença de gorduras, carboidratos, proteínas (sete vezes maior em relação a polpa), aminoácidos essenciais e minerais como: cálcio, fósforo, magnésio e potássio. Além de ácido fítico e taninos que tornam a semente inadequada pra o consumo e assim, justificando o descarte. Ganesapillai *et al.* (2017) também citam a ocorrência de flavonoides polifenólicos em sementes, compostos que tem sido associados à atividade antimicrobiana em diversos extratos vegetais.

Debnath *et al.* (2011) ao estudarem o efeito antimicrobiano de extratos de sementes de frutas, observaram a sensibilidade do *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* ao extrato de semente de tamarindo em solvente etanol 95%. Corroborando com os autores, Prabhu e Teli (2011) observaram a sensibilidade de bactérias tanto Gram-positiva (*S. aureus*) quanto Gram-negativa (*E.coli*) ao extrato aquoso de semente de tamarindo. Santos e Santana (2017) também relataram a sensibilidade da *S. Enteritidis* e *S. aureus* aos extratos etanoicos de semente de tamarindo, e *B. subtilis* e *P. aeruginosa* ao extrato etanoico de casca de tamarindo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes condições de temperatura, pH, concentração de NaCl e concentrações de extrato de casca ou de semente de tamarindo no crescimento de bactérias patogênicas.

3.2 Objetivo específicos

- Determinar a velocidade de crescimento ou inibição e o tempo da fase lag de bactérias patogênicas submetidas a diferentes condições de temperatura, pH, concentrações de cloreto de sódio e de extrato de casca tamarindo utilizando o programa “ComBase Predictor”;
- Determinar a velocidade de crescimento ou inibição e o tempo da fase lag de bactérias patogênicas submetidas a diferentes condições de temperatura, pH, concentrações de cloreto de sódio e de extrato de semente de tamarindo utilizando o programa “ComBase Predictor”;
- Avaliar a influência dos parâmetros na velocidade de crescimento ou inibição de bactérias patogênicas através de planejamento fatorial fracionado;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para a realização dos experimentos foram utilizados os reagentes de grau analítico: ácido clorídrico (Sigma, Estados Unidos), álcool etílico absoluto (Neon, Brasil), cloreto de sódio (Inlab, Brasil), ágar Muller Hinton (Kasvi, Espanha) e o meio de cultivo caldo infusão cérebro-coração (BHI) (Kasvi, Espanha).

4.2 Bactérias

Pseudomonas aeruginosa (CBAM 0679) foi adquirida da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane, Coleção de bactérias da Amazônia (CBAM) (Fiocruz, Manaus, Amazônia), *Bacillus subtilis* (INCQS 00002), *Staphylococcus aureus* (INCQS 00014), *Salmonella* Enteritidis (INCQS 00258) e *Enterococcus faecalis* (INCQS 00531) foram fornecidas pela coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz (Manguinhos, Rio de Janeiro). As estirpes foram armazenadas em caldo de infusão de cérebro coração (BHI) e solução de glicerol a 20% a - 80°C em um Ultrafreezer.

4.3 Obtenção e tratamento dos resíduos de tamarindo

Foram utilizados frutos de tamarindo adquiridos no mercado local da cidade de Guanambi, Bahia. Os frutos foram transportados até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bioengenharia da Universidade Federal de Sergipe, onde foram lavados com água potável corrente e sanitizados com hipoclorito de sódio a 200 mg/mL, por 15 min, e deixados secar à temperatura ambiente.

As cascas e sementes foram manualmente separadas da polpa, pesadas e submetidas à secagem a 50°C em estufa por 24 h. Após esse período, cada resíduo, separadamente, foi triturado em moinho de facas (Technal® Tipo Willye), até a condição de pó e acondicionados em embalagem de polietileno e mantidos sob temperatura ambiente até a condução das análises.

4.4 Obtenção dos extratos

Para obtenção dos extratos seguiu-se metodologia descrita por Santos; Santana (2017). Em frascos Erlenmeyers adicionou-se 5 g de cada resíduo separadamente (casca e semente) e 25 mL do solvente etanol a 80%. Os frascos foram mantidos sob agitação em *shaker* orbital a

200 rpm, durante 1 h a 30°C. Após esse período, o material foi filtrado em papel filtro obtendo-se o sobrenadante. O extrato filtrado foi levado ao Laboratório de Flavor e submetido à rotaevaporação a 40°C e sob 50 rpm, em rotaevaporador (Fisatom, modelo-208), para remoção do solvente.

4.5 Preparo das suspensões bacterianas

Cada cepa bacteriana foi reativada conforme metodologia descrita por Nyhan *et al.* (2018), onde procedeu-se a retirada de uma alçada da cultura estoque, adicionando-a a tubos contendo caldo BHI e posteriormente incubação a 37°C por 24 h. Então, 10 µL dessa solução foi coletada e espalhada em ágar BHI a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, uma colônia isolada que cresceu no ágar foi transferida para 20 mL de caldo BHI e novamente incubada a 37°C por 9h. Após este tempo, 20 µL da suspensão foi adicionada à 20 mL de caldo BHI mantendo-se à 37°C por 17 h (AKKERMANS; IMPE, 2018).

Por fim, foi feita a inoculação dos microrganismos repicados com o auxílio de uma alça de platina, em tubos de experimento contendo 10 mL de caldo BHI, a fim de se obter turbidez igual a escala 0,5 de Mc Farland, correspondente à concentração inicial de 10^5 a 10^6 cel/mL (MURRAY *et al.* 2003; CLSI, 2008).

4.6 Crescimento de bactérias patogênicas em diferentes condições de cultivo

O crescimento das bactérias patogênicas foi avaliado em meio de cultivo contendo diferentes pHs (5,0-9,0), concentração de NaCl (0-8,5%) e concentração de extrato da casca ou da semente de tamarindo (0-10%) e incubação em diferentes temperaturas (10 a 45°C) de acordo com o planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais (ILIADIS *et al.*, 2018). Os valores dos parâmetros foram variados conforme demonstrado na Tabela 1.

Para a realização de cada experimento, em tubos de experimento adicionou-se 10 mL de caldo BHI contendo as porcentagens de NaCl e extrato de resíduo de tamarindo (casca ou semente) conforme a Tabela 1. O pH do meio foi ajustado utilizando-se solução de hidróxido de sódio 1N ou ácido clorídrico 1N. Em seguida adicionou-se ao meio 100 µL do inóculo de cada bactéria padronizada a 10^5 e 10^6 UFC/mL, conforme solução de Mc Farland. Os tubos foram incubados nas temperaturas sugeridas durante 8 h (ILIADIS *et al.* (2018) com modificações).

Para a obtenção da curva de crescimento/inibição bacteriana removeu-se um tubo de experimento nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 h. A partir destas suspensões realizou-se diluições seriadas e 0,01 mL de cada amostra foi espalhado na superfície de ágar Mueller Hilton

solidificado em placas de petri, através da técnica de plaqueamento por microgotas, segundo metodologia descrita por Silva (2007). Em seguida, as placas foram incubadas à 37° C durante 24 h em estufa BOD (SPLABOR-Modelo SP-500, Brasil). Em seguida, realizou-se as contagens das colônias e os resultados foram expressos em Log UFC/mL (GONÇALVES *et al.*, 2015 com modificações). As 5 cepas bacterianas foram incubadas nas condições de cada experimento descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis reais e codificadas do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais.

Experimento	Temperatura	pH	Cloreto de Sódio (%)	Extrato casca ou semente (%)
1	(-1) 10,0	(-1) 5,0	(-1) 0	(-1) 0
2	(+1) 45,0	(-1) 5,0	(-1) 0	(+1) 10
3	(-1) 10,0	(+1) 9,0	(-1) 0	(+1) 10
4	(+1) 45,0	(+1) 9,0	(-1) 0	(-1) 0
5	(-1) 10,0	(-1) 5,0	(+1) 8,5	(+1) 10
6	(+1) 45,0	(-1) 5,0	(+1) 8,5	(-1) 0
7	(-1) 10,0	(+1) 9,0	(+1) 8,5	(-1) 0
8	(+1) 45,0	(+1) 9,0	(+1) 8,5	(+1) 10
9	(0) 28,0	(0) 7,0	(0) 4,3	(0) 5
10	(0) 28,0	(0) 7,0	(0) 4,3	(0) 5
11	(0) 28,0	(0) 7,0	(0) 4,3	(0) 5

4.7 Obtenção dos parâmetros de crescimento microbiano

A partir dos resultados obtidos no item 4.5 utilizou-se o modelo primário de Baranyi e Roberts (1994) disponível o site ComBase (www.combase.cc) com auxílio do aplicativo DMFit 3.0, para determinar a velocidade máxima de crescimento/inibição ($\mu_{\text{máx}}$) e o tempo da fase lag (λ) de cada bacteriana testada em cada experimento.

4.8 Efeito dos parâmetros na velocidade de crescimento das bactérias

O efeito dos parâmetros pH, temperatura, NaCl e extrato dos resíduos de tamarindo foram avaliados pelo programa Statistic 8.0 e as curvas de crescimento/inibição foram construídas utilizando-se o Programa OriginPro 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento bacteriano em meio de cultivo contendo extrato de cascas de tamarindo

A velocidade máxima de crescimento e o tempo da fase lag das cinco bactérias patogênicas estudadas em diferentes condições de pH, temperatura, NaCl e extrato em etanol 80% (v/v) de casca de tamarindo e incubadas foram determinados segundo o modelo de Baranyi e Roberts e os resultados estão demonstrados na Tabela 2. O modelo de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados experimentais obtendo-se coeficientes de correlação que variaram entre 0,82 e 0,98. Todas as bactérias demonstraram crescimento apenas na condição do experimento 4 (temperatura 45°C, pH 9,0, 0,0% NaCl e 0,0% de extrato), ou seja na ausência de NaCl e extrato da casca de tamarindo. Nesta condição, apenas a *P. aeruginosa* não apresentou tempo de fase lag, o que significou que esta bactéria não necessitou de tempo de adaptação para o crescimento. Nas demais condições experimentais houve diminuição do crescimento bacteriano ao longo do tempo de incubação. O *S. aureus* apresentou maior tempo de fase lag (2,05 h) no experimento 7 (temperatura 10°C, pH 9,0, 8,5% NaCl e 0,0% de extrato) e o *E. faecalis* no experimento 4 (5,88 h) (temperatura 45°C, pH 9,0, 0,0% NaCl e 0,0% de extrato). Este comportamento significou que estas bactérias demonstraram maior tempo de adaptação às condições experimentais, tendo em seguida a diminuição do crescimento conforme visualizado nas curvas de crescimento (Figuras 2-6).

Através das curvas de crescimento verificou-se que as maiores taxas de inibição foram obtidas para o *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* com redução de 3,0, 2,6 e 2,6 ciclos log, respectivamente, em relação à contagem inicial (tempo zero) nos experimentos 9, 10 e 11 (28°C, pH 7,0, 4,3% NaCl e 5% de extrato de casca de tamarindo) (Figura 2, 3 e 5). Adelskov; Patel (2016) relataram que o *B. subtilis* tem faixa de crescimento entre 24 e 50°C e crescimento ótimo em pH 7,0. Porém no presente trabalho, mesmo dentro das condições ótimas de crescimento houve a inibição, provavelmente devido a presença de sal e extrato da casca de tamarindo. Yüzügüllü-Karakuş et al. (2018) ao estudarem o crescimento do *B. subtilis* relataram que na presença de 5% de NaCl este microrganismo não apresentou crescimento. Song et al. (2019) relataram que sob condições subletais o *S. aureus* tende a aumentar a tolerância ao NaCl. Rubab et al. (2018), no entanto, citam que essa espécie é capaz de sobreviver mesmo sob elevadas temperaturas e elevadas concentrações salinas e podem resistir a baixo pH. Santos; Santana (2016) ao estudarem o efeito antimicrobiano de extrato etanólico de casca de tamarindo também relataram a sensibilidade destas bactérias ao extrato testado.

Para o *E. faecalis* observou-se que a maior redução (2,3 ciclos log) foi observada no experimento 8 (45°C, pH 9, 8,5% NaCl e 10% de extrato) (Figura 3). Esta bactéria tem demonstrado resistência a meios com pH entre 2 e 10 (YANG et al., 2019), porém menor crescimento tem sido observado em maiores concentrações de NaCl (8%) (LIU et al., 2015).

A *S. Enteritidis* apresentou redução de 2,5 ciclos log no experimento 5 (10°C, pH 5, 8,5% NaCl e 10% extrato da casca de tamarindo) (Figura 6). Esta espécie patogênica possui capacidade de resistir às condições ácidas e esta adaptação pode induzir proteção do microrganismo contra estresse por calor, frio e condições salinas (KANG et al., 2018; YE et al., 2019). Logo, a provável redução do crescimento desta bactéria no presente trabalho pode ser devido a presença do extrato da casca de tamarindo do meio de cultivo.

Tabela 2. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Variáveis independentes				Variáveis resposta		R ²
		Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Extrato da casca de tamarindo (%)	λ (h)	$\mu_{\text{máx}}$ (Log UFC/mL h)	
<i>B. subtilis</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,33	0,93
	2	45	5,0	0	10	0	-0,25	0,86
	3	10	9,0	0	10	0	-0,05	0,85
	4	45	9,0	0	0	3,0	0,38	0,92
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,37	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,19	0,93
	7	10	9,0	8,5	0	3,5	-0,14	0,95
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,24	0,98
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,46	0,97
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,44	0,97
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,39	0,93
<i>P. aeruginosa</i>	1	10	5,0	0	0	4,51	-0,42	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,23	0,93
	3	10	9,0	0	10	4,81	-1,11	0,97
	4	45	9,0	0	0	0	0,05	0,88
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,38	0,91
	6	45	5,0	8,5	0	3,69	-0,23	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,04	0,90
	8	45	9,0	8,5	10	1,49	-0,48	0,98
	9	28	7,0	4,3	5	2,77	-6,04	0,95
	10	28	7,0	4,3	5	2,76	-5,34	0,93
	11	28	7,0	4,3	5	2,76	-5,27	0,98

Continuação da Tabela 2. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Variáveis independentes				Variáveis resposta		R ²
		Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Extrato da casca de tamarindo (%)	λ (h)	$\mu_{\max}$ (Log UFC/mL h)	
<i>E. faecalis</i>	1	10	5,0	0	0	2,37	-0,68	0,97
	2	45	5,0	0	10	3,29	-0,60	0,94
	3	10	9,0	0	10	0	-0,30	0,83
	4	45	9,0	0	0	5,88	0,84	0,90
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,32	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	2,64	-0,18	0,97
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,05	0,93
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,32	0,97
	9	28	7,0	4,3	5	1,57	-0,44	0,98
	10	28	7,0	4,3	5	1,99	-0,45	0,96
	11	28	7,0	4,3	5	2,07	-0,46	0,96
<i>S. aureus</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,31	0,82
	2	45	5,0	0	10	0	-0,26	0,94
	3	10	9,0	0	10	1,91	-1,06	0,95
	4	45	9,0	0	0	1,92	0,44	0,95
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,24	0,94
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,08	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	2,05	-0,09	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,21	0,85
	9	28	7,0	4,3	5	1,87	-0,40	0,96
	10	28	7,0	4,3	5	1,26	-0,29	0,97
	11	28	7,0	4,3	5	1,50	-0,27	0,91

S. Enteritidis	1	10	5,0	0	0	0	-0,36	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,32	0,96
	3	10	9,0	0	10	4,86	-1,09	0,97
	4	45	9,0	0	0	3,78	0,85	0,98
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,35	0,94
	6	45	5,0	8,5	0	1,61	-0,13	0,98
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,12	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,30	0,91
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,36	0,97
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,22	0,90
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,24	0,89

λ , duração da fase lag; $\mu_{\max}$, taxa de crescimento máximo; R^2 , coeficiente de correlação.

Figura 2- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *B. subtilis* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH 5,0, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

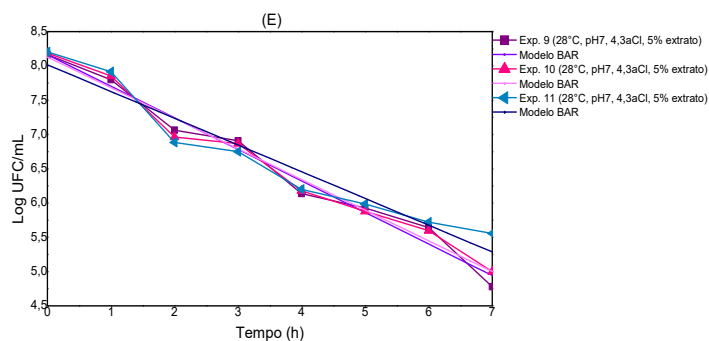
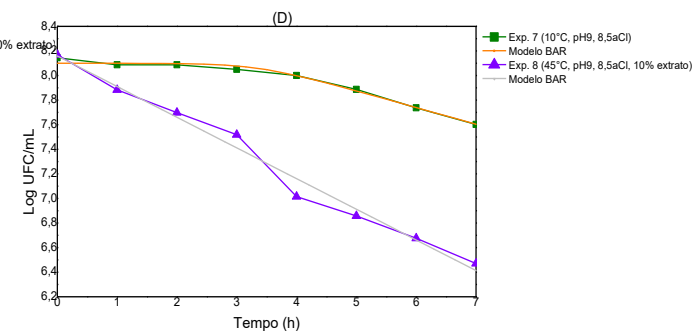
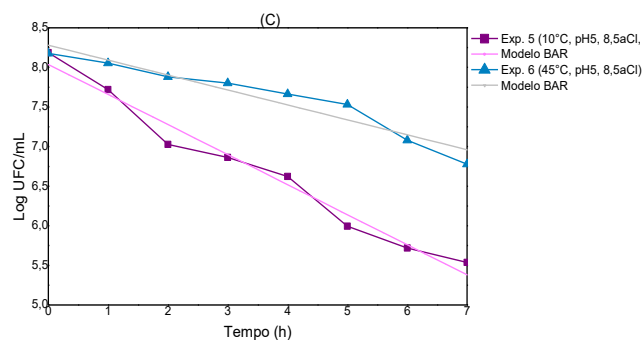
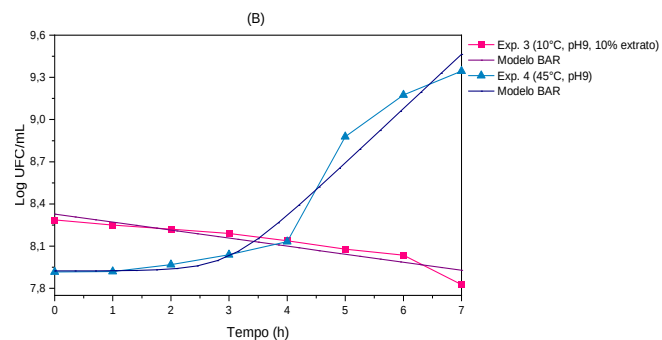
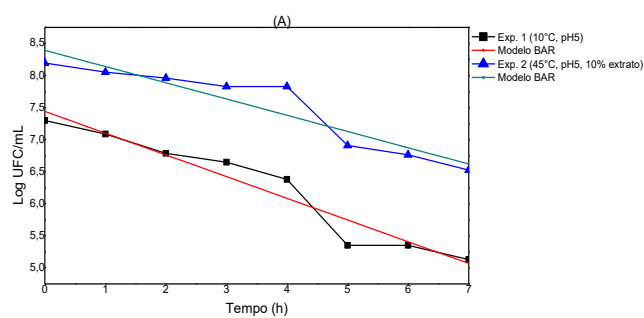


Figura 3-Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *E. Faecallis* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

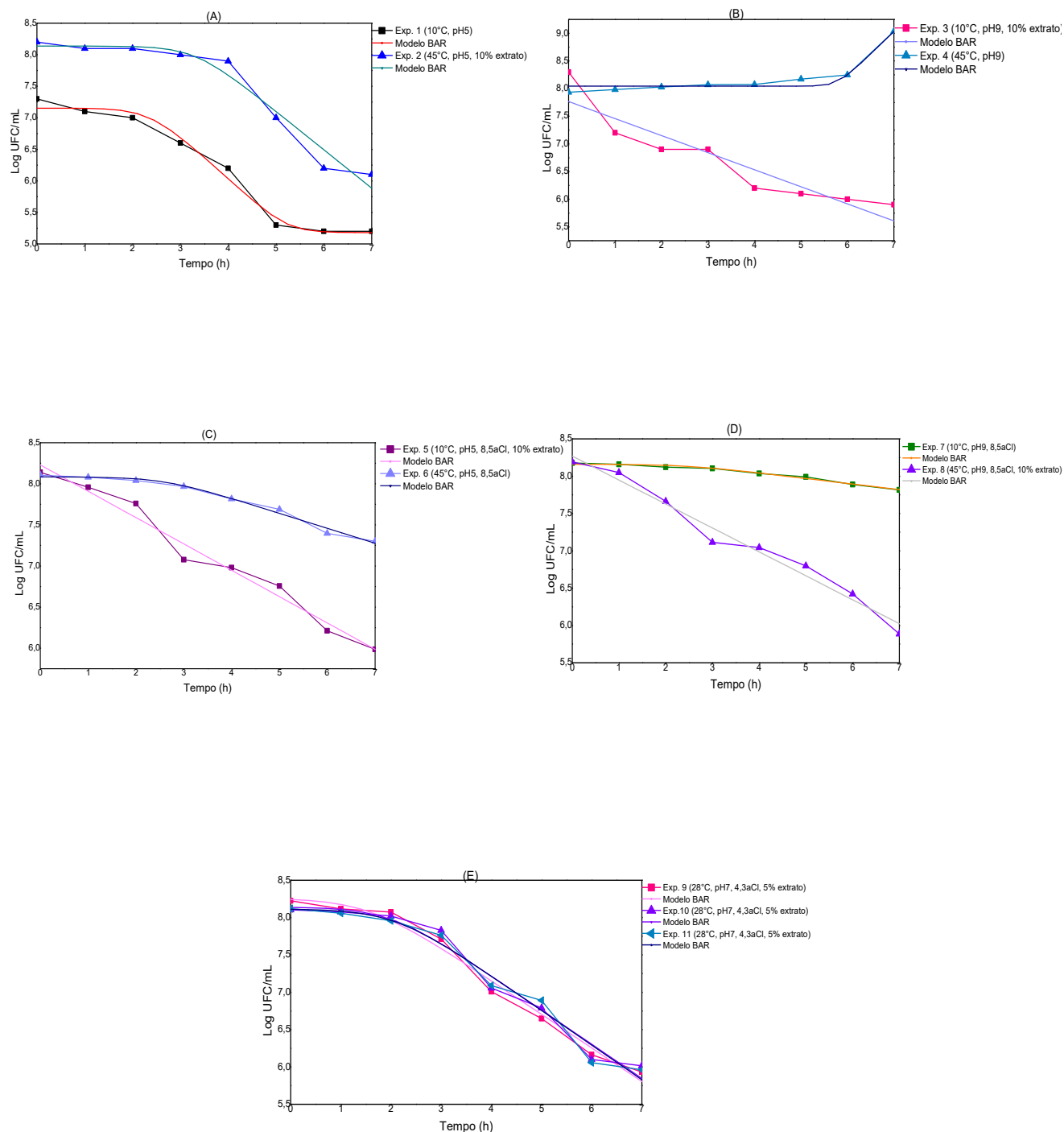


Figura 4- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *P. aeruginosa* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

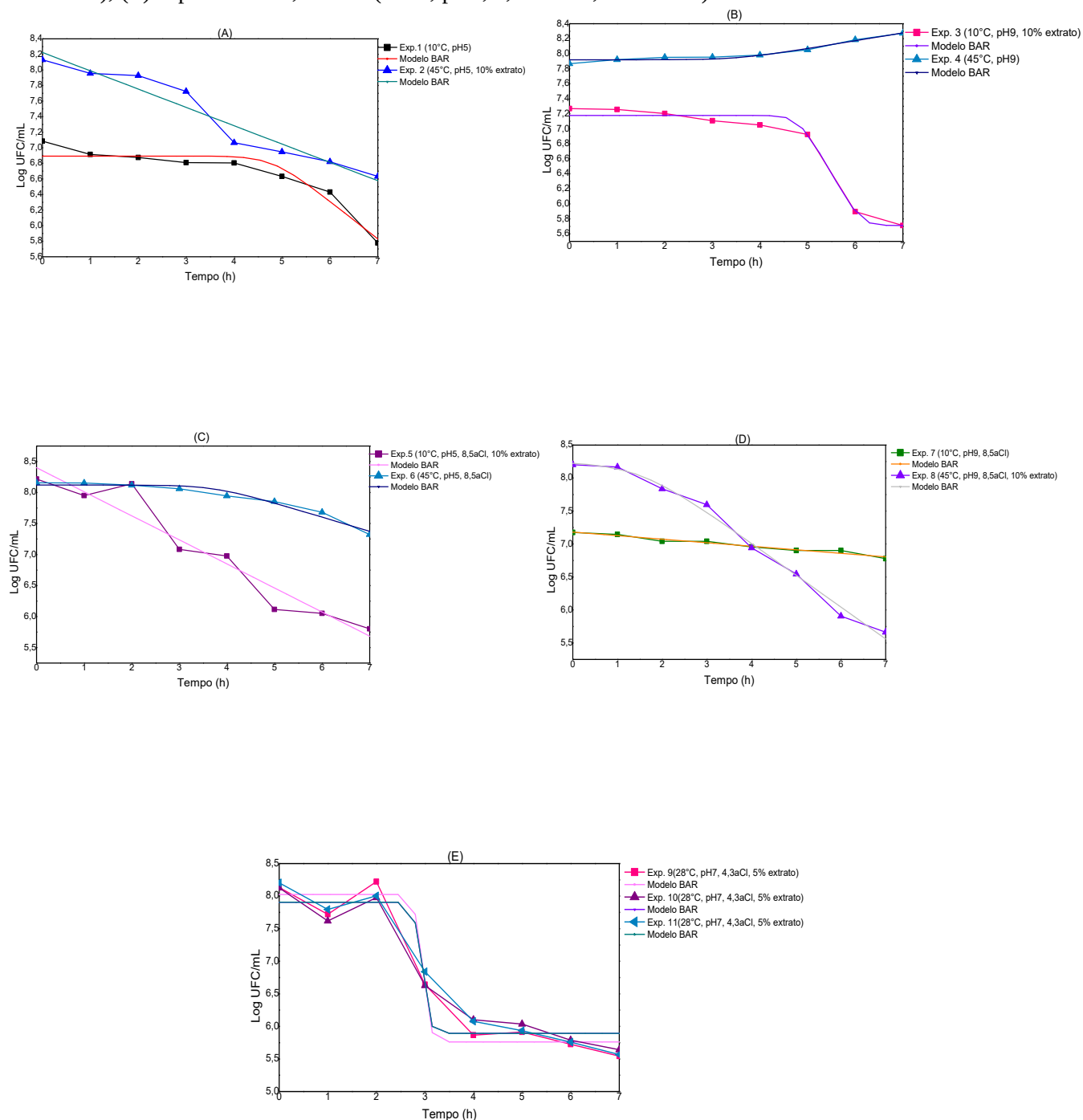


Figura 5- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. aureus* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

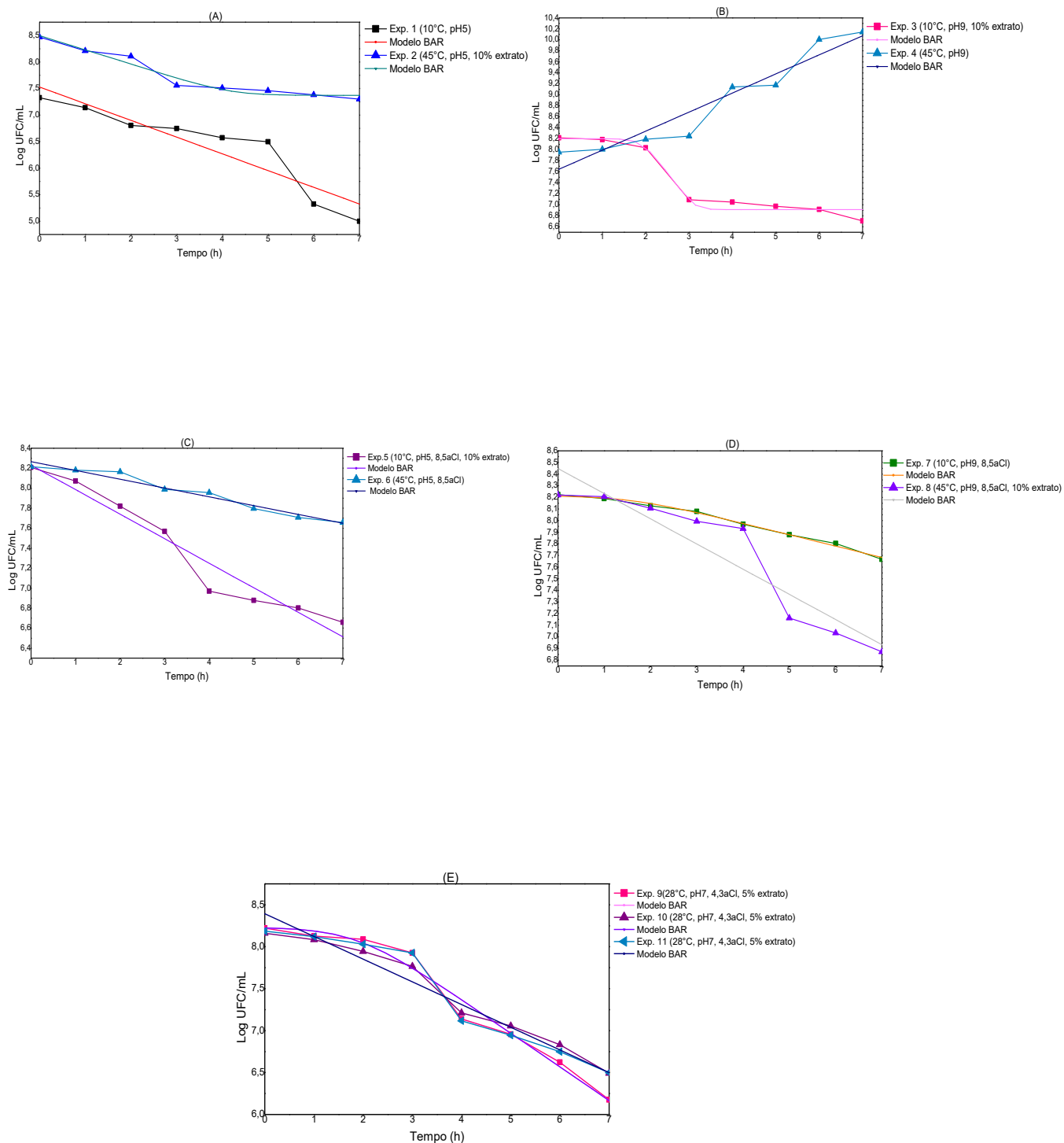
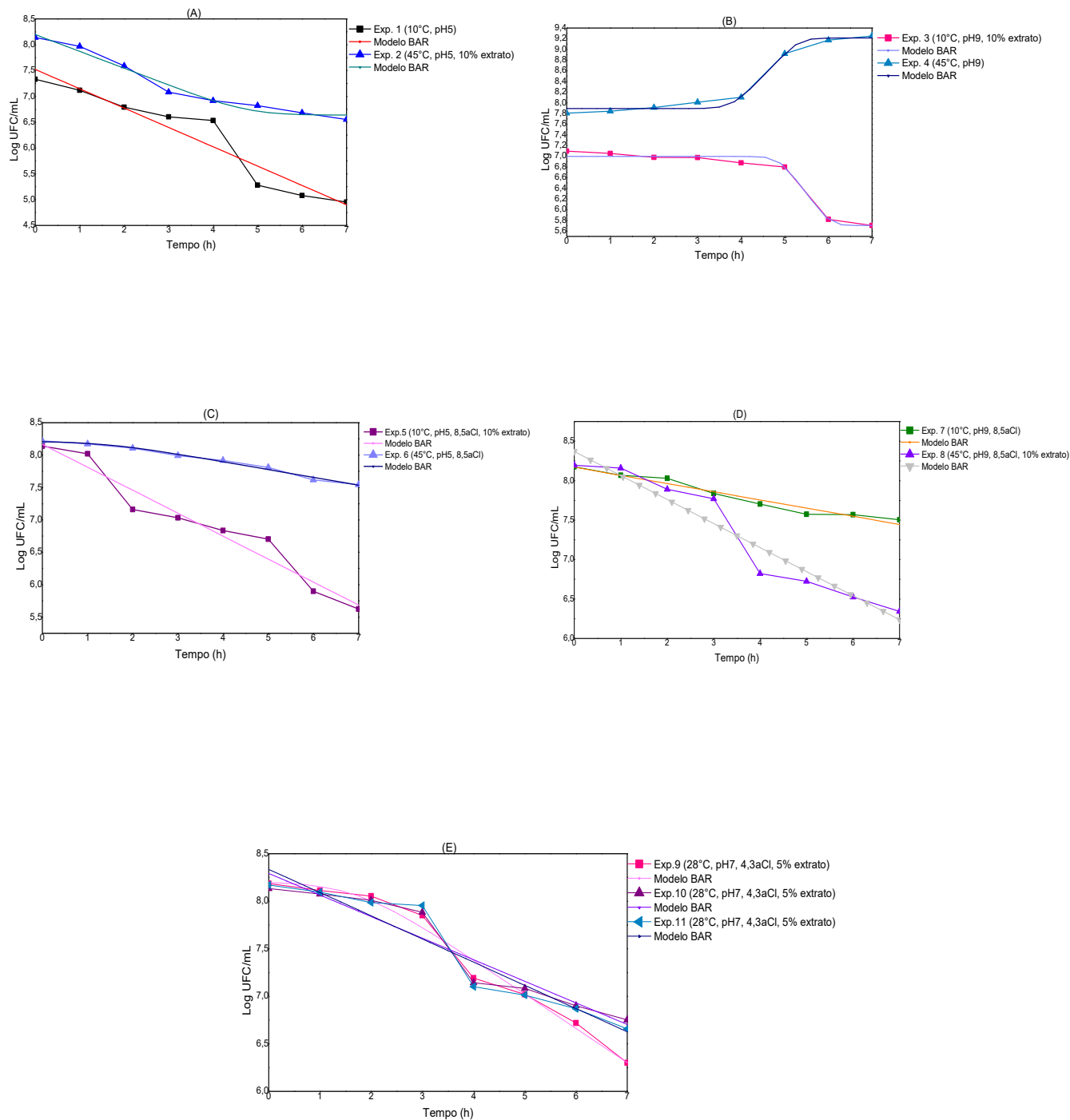


Figura 6- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. Enteritidis* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).



5.2 Avaliação do crescimento bacteriano em meio de cultivo contendo extrato de sementes de tamarindo

O modelo de Baranyi e Roberts foi utilizado para avaliar o crescimento das cinco bactérias patogênicas estudadas, expostas à diferentes concentrações de pH, temperatura, NaCl e extrato etanoico de semente de tamarindo, os resultados de fase lag e velocidade máxima de crescimento estão expressos na Tabela 3. O modelo de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados experimentais e obteve-se coeficientes de correlação entre 0,72 e 1.

Com exceção do *B. subtilis* e da *S. Enteritidis*, todos os microrganismos apresentaram fase lag nos experimentos 9, 10 e 11 (temperatura 28°C, pH 7,0, 4,3% NaCl e 5,0% de extrato de semente de tamarindo). Contudo, o *B. subtilis* apresentou fase lag que variou de 3,0 a 3,8 nos experimentos 2, 4, 5 e 7. Com maior tempo de fase lag (3,8 h) no experimento 5 (temperatura 10° C, pH 5,0, 8,5% de NaCl e 10% de extrato). A *P. aeruginosa* apresentou maior tempo de fase lag (4,51 h) no experimento 1 (10°C e pH 5,0, 0,0% NaCl e 0,0% de extrato de semente de tamarindo). O maior tempo de fase lag (5,88 h) foi obtido para o *E. faecalis*, no experimento 4 (45°C, pH 9,0), ou seja nos valores máximos de temperatura e pH e na ausência concentração de sal e de extrato. O segundo maior tempo de fase lag foi obtido para o *S. aureus* no experimento 2 (45°C, pH 5,0 e 10% de extrato). Aguirre *et al.* (2011) relatam que quando o microrganismo está exposto a um meio estressante e as condições não são favoráveis para o crescimento, como estratégia de sobrevivência, há um tendência de aumento da fase lag para adaptação ao meio. Portanto, se o ambiente influencia na fase lag, o ideal seria manter os microrganismos nessa fase por longos períodos de tempo (VERCAMMEN *et al.*, 2017).

Através das curvas de crescimento demonstradas nas Figuras 7-11, verificou-se que apenas no experimento 4 (temperatura 45°C, pH 9,0, 0,0% NaCl e 0,0% de extrato) todas as bactérias demonstraram crescimento ao longo do tempo de incubação de cerca de 2 ciclos Log, com exceção da *P. aeruginosa* que aumentou apenas 1 ciclo Log. O *B. subtilis* apresentou maior redução (2,2 ciclos log) no experimento 1 (10°C e pH 5,0) (Figura 7). Segundo Duan *et al.* (2020) esse patógeno resiste a elevadas temperaturas, e seu crescimento ótimo ocorre em pH 7 (ADELSKOV; PATEL, 2016). Logo, a combinação de baixa temperatura e pH ácido contribuiu para redução das contagens ao longo do tempo de análise.

Do mesmo modo, a *S. Enteritidis*. e o *E. faecalis* foram mais sensíveis à condição do experimento 1 com redução de 2,3 e 2,1 ciclos log. Apesar do *E. faecalis* resistir a pH entre 2,0 e 10,0 (YANG *et al.*, 2019) e temperaturas entre 5 e 65°C (Fisher, 2009), provavelmente por não estarem dentro da faixa ótima de crescimento a combinação desses dois fatores

contribuíram para a redução do crescimento. Enquanto que para a *P. aeruginosa*, a maior redução ocorreu no experimento 2 onde utilizou-se maior concentração de extrato (10°C, pH 9,0 e 10% extrato de semente de tamarindo) com redução de 1,6 log (Figura 9). Lima et al. (2017); Paz et al. (2015) relataram a sensibilidade da *P. aeruginosa* à extratos etanoicos de tamarindo.

Rubab et al. (2018), citam que o *S. aureus* pode ser capaz de sobreviver mesmo em condições de temperaturas elevadas e em ambientes com quantidade alta de NaCl. Contudo, essa bactéria apresentou a maior redução logarítmica, quando comparada as demais, no experimento 8, onde as condições de cultivo foram 45°C e 8,5% de NaCl (Figura 10). Mesmo tendo a capacidade de sobreviver nestas condições o *S. aureus* apresentou redução de 3,5 log, tal fato pode ser explicado provavelmente devido a elevada concentração de extrato de tamarindo para este ensaio (10%), visto que, na literatura é possível encontrar relatos da sensibilidade deste microrganismo a extrato de semente de tamarindo (EADLAPALLI et al., 2016; SINHA et al., 2019).

Tabela 3. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Variáveis independentes				Variáveis resposta		R ²
		Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Extrato da semente de tamarindo (%)	λ (h)	$\mu_{\max}$ (Log UFC/mL h)	
<i>B. subtilis</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,33	0,93
	2	45	5,0	0	10	3,0	-0,29	0,93
	3	10	9,0	0	10	0	-0,09	0,89
	4	45	9,0	0	0	3,0	0,38	0,92
	5	10	5,0	8,5	10	3,8	-0,20	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,19	0,93
	7	10	9,0	8,5	0	3,5	-0,14	0,95
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,03	0,87
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,16	0,95
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,16	0,85
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,25	0,93
<i>P. aeruginosa</i>	1	10	5,0	0	0	4,51	-0,42	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,19	0,72
	3	10	9,0	0	10	2,36	-0,14	0,96
	4	45	9,0	0	0	0	0,05	0,88
	5	10	5,0	8,5	10	3,33	-0,22	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	3,69	-0,23	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,04	0,90
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,11	0,97
	9	28	7,0	4,3	5	2,33	-0,13	0,90
	10	28	7,0	4,3	5	2,34	-0,16	0,98
	11	28	7,0	4,3	5	3,36	-0,27	0,98

Continuação da tabela 3. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Variáveis independentes				Variáveis resposta		R ²
		Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Extrato da semente de tamarindo (%)	λ (h)	$\mu_{\max}$ (Log UFC/m L h)	
<i>E. faecalis</i>	1	10	5,0	0	0	2,37	-0,68	0,97
	2	45	5,0	0	10	0,25	-0,67	1
	3	10	9,0	0	10	0	-0,09	0,88
	4	45	9,0	0	0	5,88	0,84	0,90
	5	10	5,0	8,5	10	3,94	-0,30	0,91
	6	45	5,0	8,5	0	2,64	-0,18	0,97
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,05	0,93
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,08	0,92
	9	28	7,0	4,3	5	4,07	-0,15	0,93
	10	28	7,0	4,3	5	3,70	-0,13	0,94
	11	28	7,0	4,3	5	4,0	-0,15	0,92
<i>S. aureus</i>	1	10	5,0	0	0	0	-0,31	0,82
	2	45	5,0	0	10	4,72	-0,82	0,92
	3	10	9,0	0	10	0	-0,09	0,89
	4	45	9,0	0	0	1,92	0,44	0,95
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,08	0,97
	6	45	5,0	8,5	0	0	-0,08	0,90
	7	10	9,0	8,5	0	2,05	-0,09	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	0	-0,45	0,95
	9	28	7,0	4,3	5	3,34	-0,19	0,94
	10	28	7,0	4,3	5	3,70	-0,13	0,94
	11	28	7,0	4,3	5	3,50	-0,12	0,98

Continuação da tabela 3. Variáveis reais do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais e variáveis resposta obtidas a partir do modelo primário de Baranyi e Roberts.

Bactérias	Experimento	Variáveis independentes				Variáveis resposta		R ²
		Temperatura (°C)	pH	NaCl (%)	Extrato da semente de tamarindo (%)	λ (h)	$\mu_{\max}$ (Log UFC/m L h)	
S. Enteritidis	1	10	5,0	0	0	0	-0,36	0,90
	2	45	5,0	0	10	0	-0,19	0,80
	3	10	9,0	0	10	0	-0,08	0,78
	4	45	9,0	0	0	3,78	0,85	0,98
	5	10	5,0	8,5	10	0	-0,17	0,90
	6	45	5,0	8,5	0	1,61	-0,13	0,98
	7	10	9,0	8,5	0	0	-0,12	0,97
	8	45	9,0	8,5	10	2,2	-0,06	0,86
	9	28	7,0	4,3	5	0	-0,12	0,99
	10	28	7,0	4,3	5	0	-0,14	0,92
	11	28	7,0	4,3	5	0	-0,10	0,98

λ , duração da fase lag; $\mu_{\max}$, taxa de crescimento máximo; R², coeficiente de correlação.

Figura 7- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *B. subtilis* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

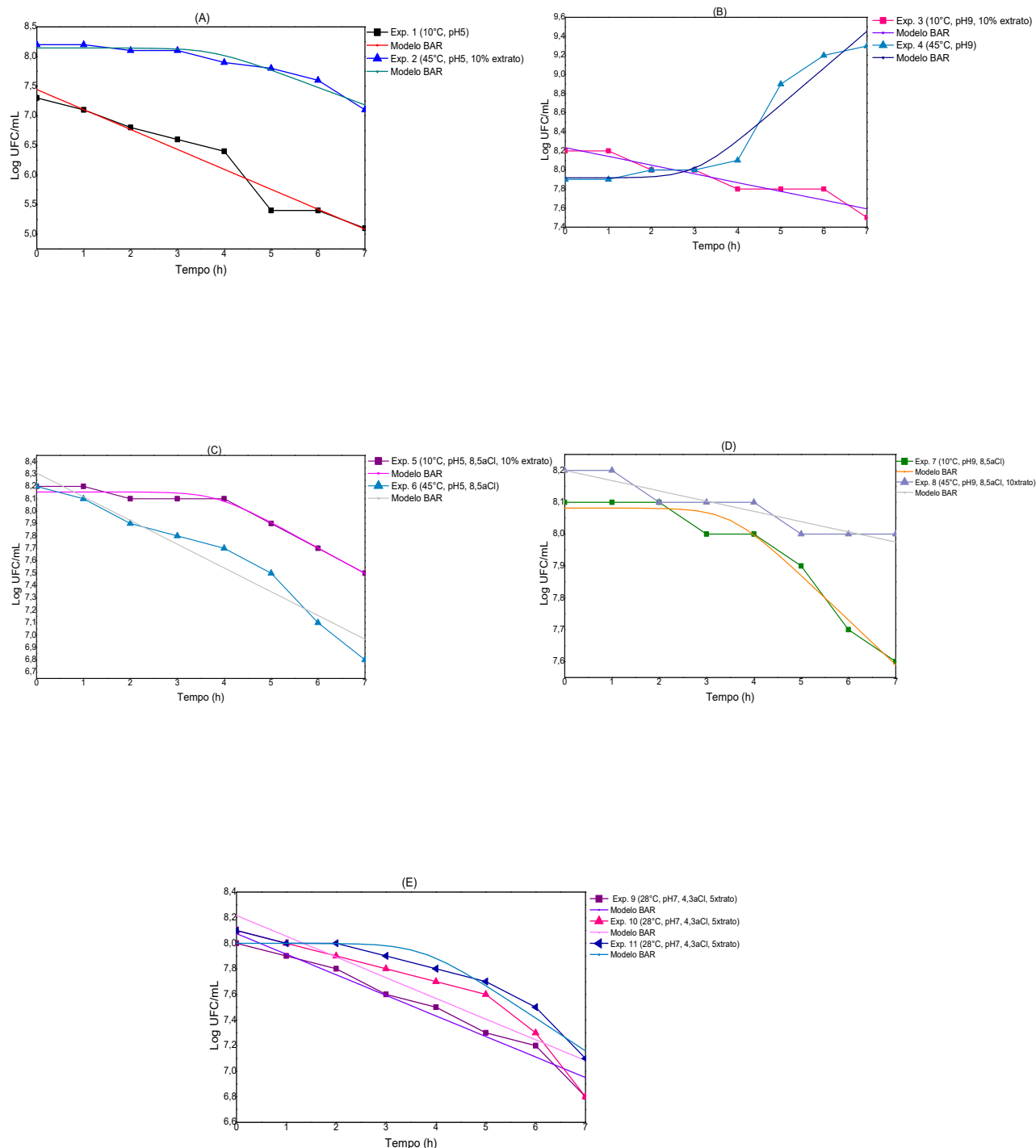


Figura 8- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *E. Faecallis* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

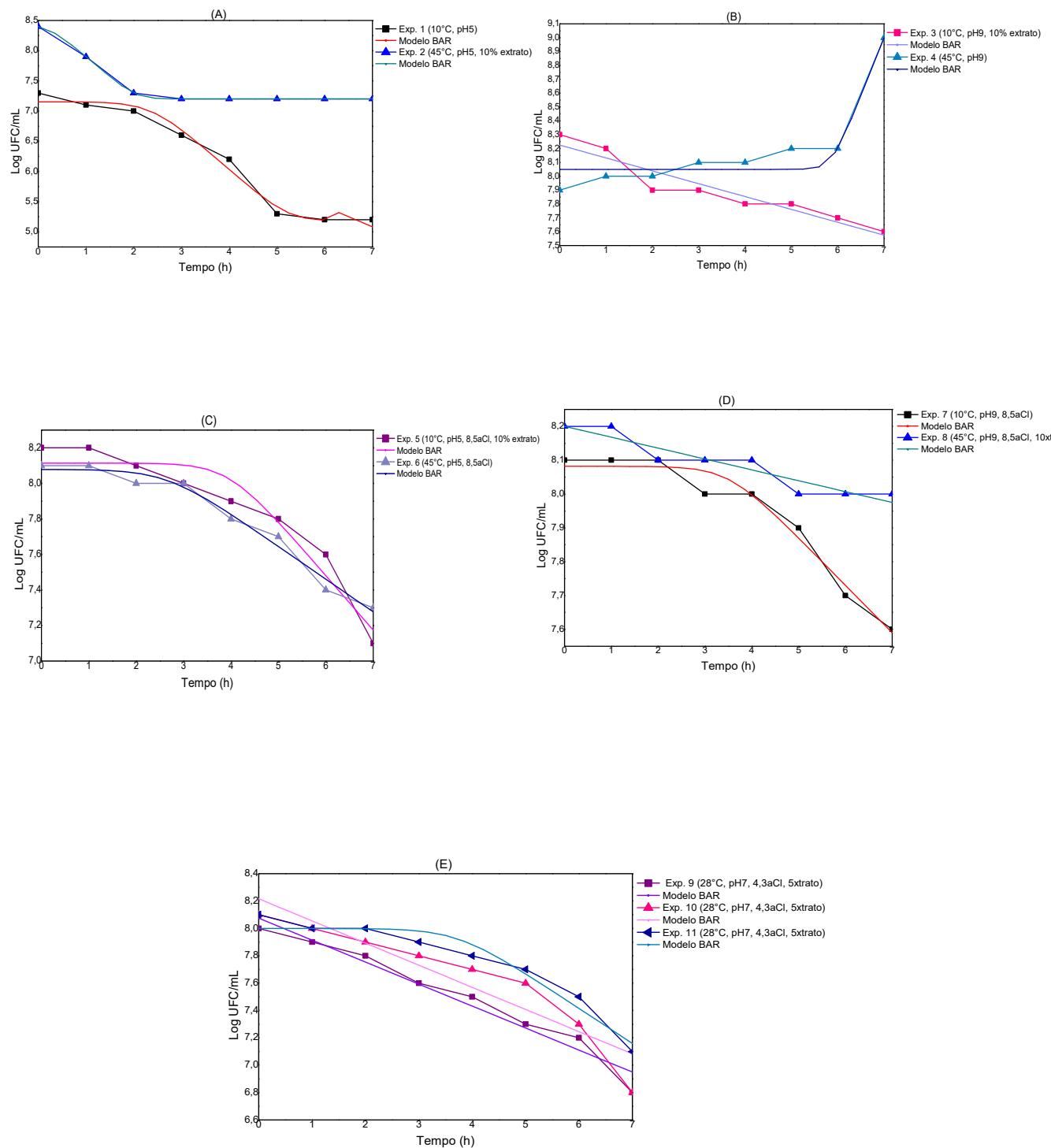


Figura 9- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *P. aeruginosa* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

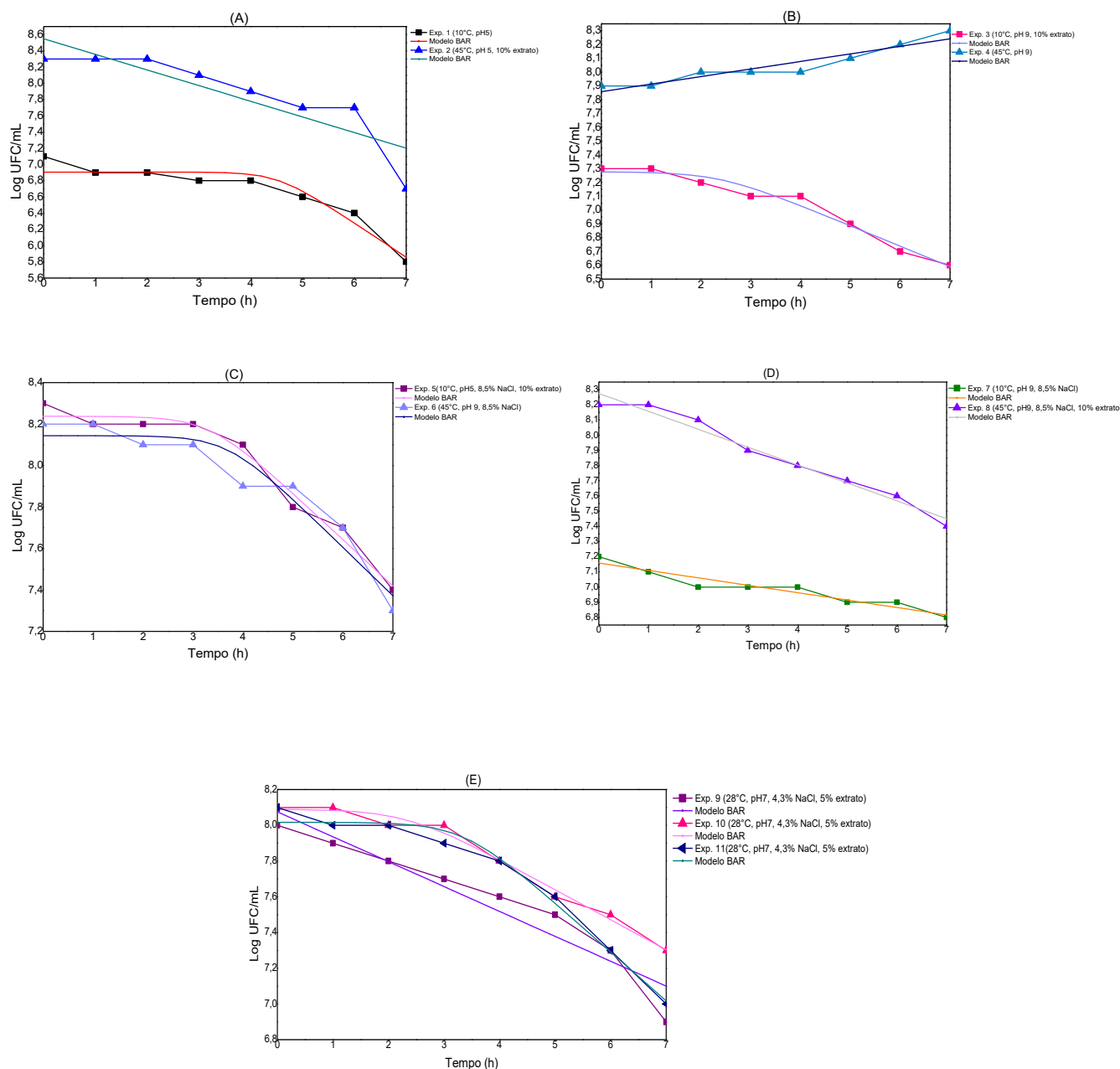


Figura 10- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. aureus* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).

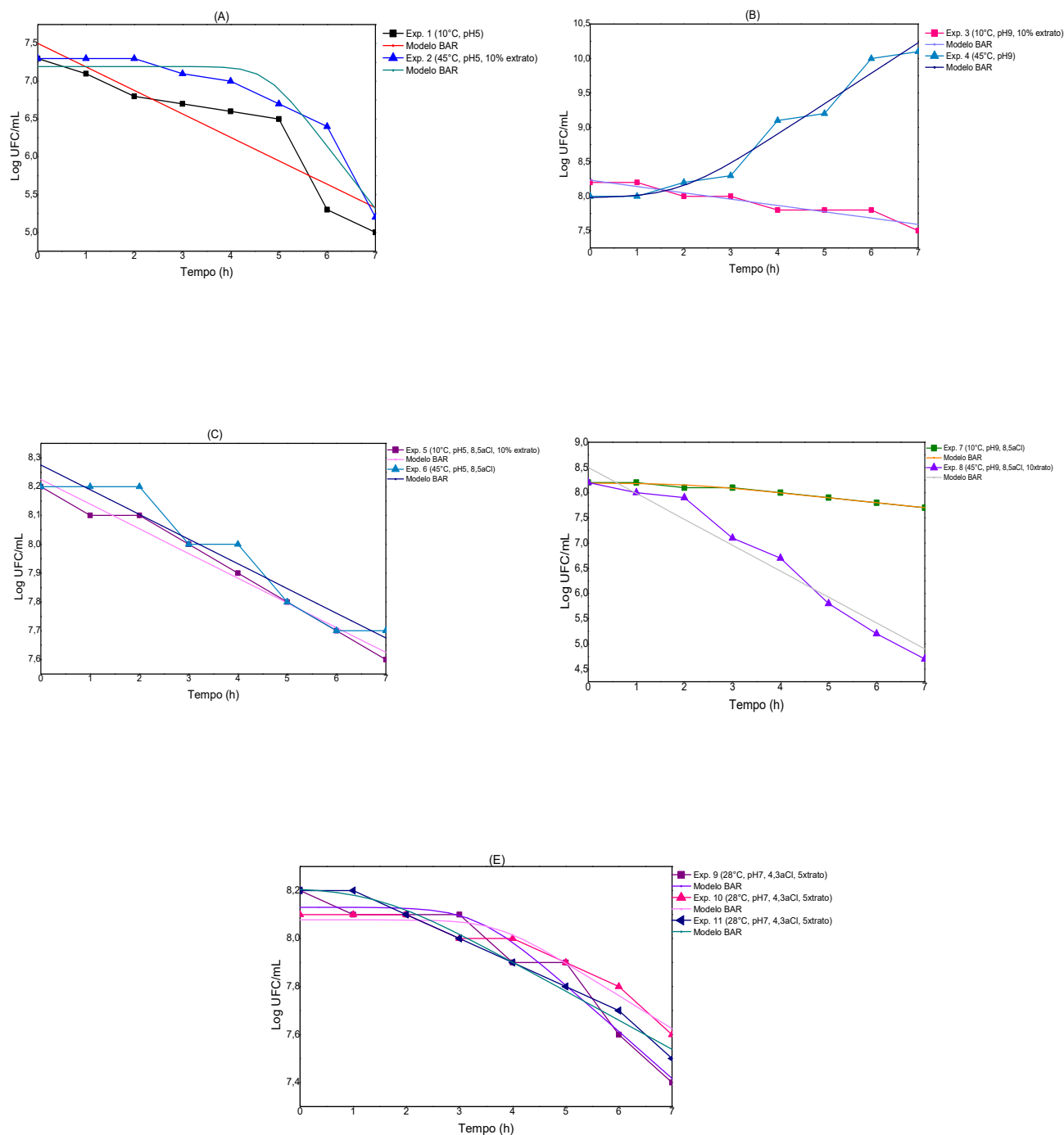
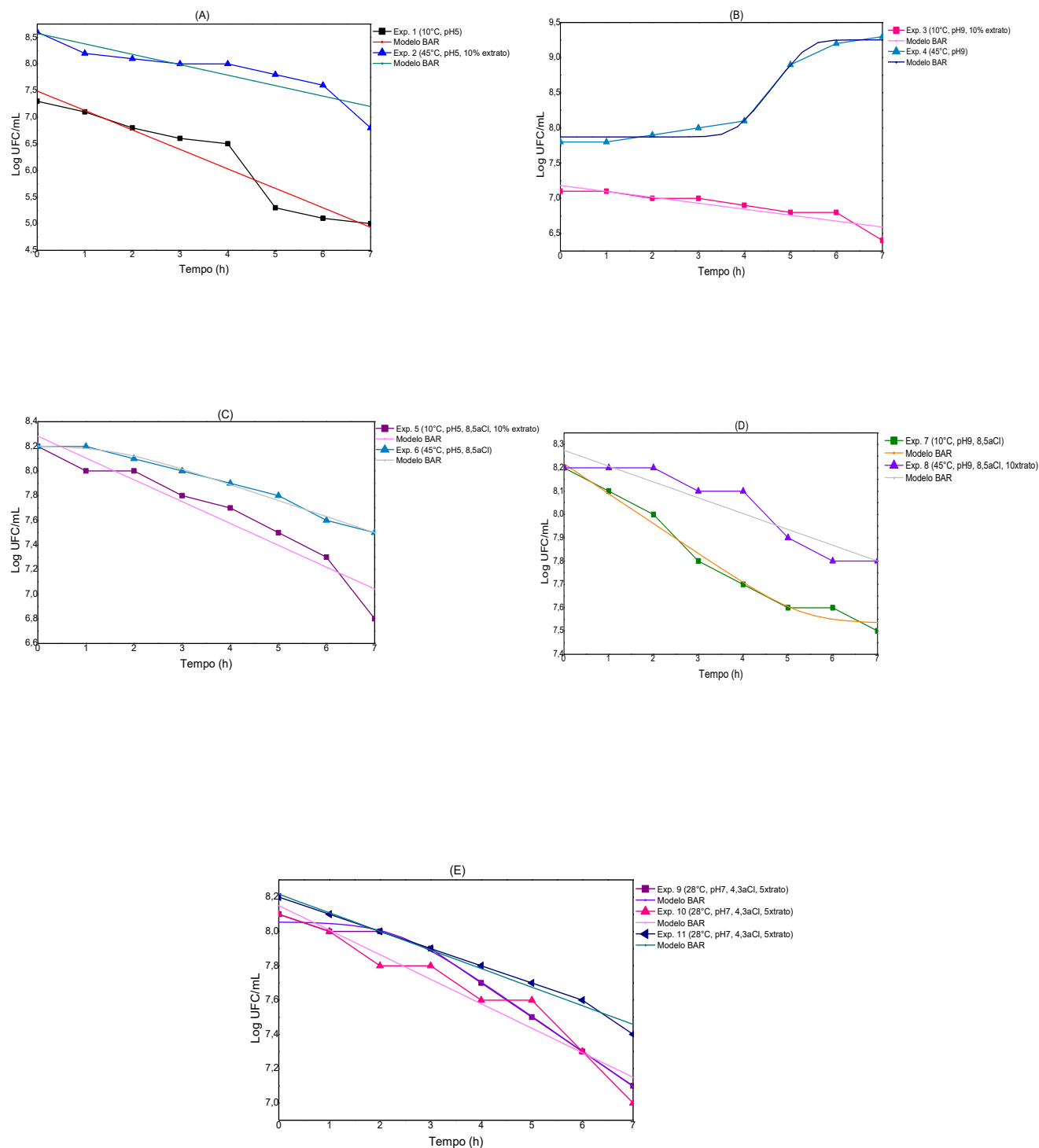


Figura 11- Modelo primário (Baranyi e Roberts) do crescimento de *S. Enteritidis* nas seguintes condições: (A) experimento 1 (10°C, pH5) e experimento 2 (45°C, pH 5,0); (B) experimento 3 (10°C, pH9, 10%extrato) e experimento 4 (45°C, pH9); (C) experimento 5 (10°C, pH5, 8,5%NaCl, 10%extrato) e experimento 6 (45°C, pH5, 8,5%NaCl); (D) experimento 7(10°C, pH9, 8,5%NaCl) e experimento 8(45°C, pH9, 8,5%NaCl, 10%extrato); (E) experimento 9,10 e 11 (28°C, pH7, 4,3%NaCl, 5%extrato).



5.3 Influência dos parâmetros no crescimento das bactérias patogênicas

O efeito das variáveis independentes (pH, NaCl, temperatura e extrato da casca de tamarindo) sobre a velocidade máxima de crescimento bacteriano foi avaliado estatisticamente através dos diagramas de Pareto demonstrados na Figura 12 e 13.

A partir da Figura 12A, é possível perceber que para o *B. subtilis*, todos os parâmetros apresentaram influência significativa ($p < 0,05$). Tendo o pH apresentado maior efeito, com valor positivo, ou seja, quanto maior o pH maior a inibição do *B. subtilis*.

Para a *P. aeruginosa* (Figura 12B), todas as variáveis foram significativas ($p < 0,05$), sendo o maior efeito pelo pH, quanto maior valor maior a taxa de inibição. Gonçalves *et al.* (2017) obtiveram um resultado oposto ao investigarem a influência da temperatura e pH no crescimento da *Pseudomonas fluorescens* em caldo de carne, concluíram que o pH teve efeito sob a queda de crescimento do microrganismo, quanto menor o pH estudado menores os valores de taxa máxima de crescimento.

Para o *E. faecalis* (Figura 12C), todos os parâmetros influenciaram estatisticamente ($p < 0,05$) o crescimento. Com destaque para o pH, que apresentou maior influência, com efeito positivo, ou seja, quanto maior o valor de pH maior a redução nas contagens do *E. faecalis*. O cloreto de sódio apresentou o menor valor de influência estatisticamente significativa dentro da faixa estudada, isso por que segundo Fisher (2009) afirma que é da natureza deste microrganismo resistir a elevadas concentrações de NaCl.

Verificou-se para o *S. aureus* (Figura 13A), apenas o extrato da casca de tamarindo e a temperatura apresentaram significância ($p < 0,05$). Sendo mais significativo o extrato da casca, ou seja, quanto maior os valores de extrato menor a inibição.

Do mesmo modo, para a *S. Enteritidis* (Figura 13B) apenas o extrato da casca de tamarindo e temperatura obtiveram efeito significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Sendo quanto menores as concentrações de extrato e maiores os valores de temperatura, maior será a inibição deste microrganismo.

Figura 12. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo frente a velocidade de crescimento do (A) *B. subtilis*, (B) *P. aeruginosa*, (C) *E. faecalis*.

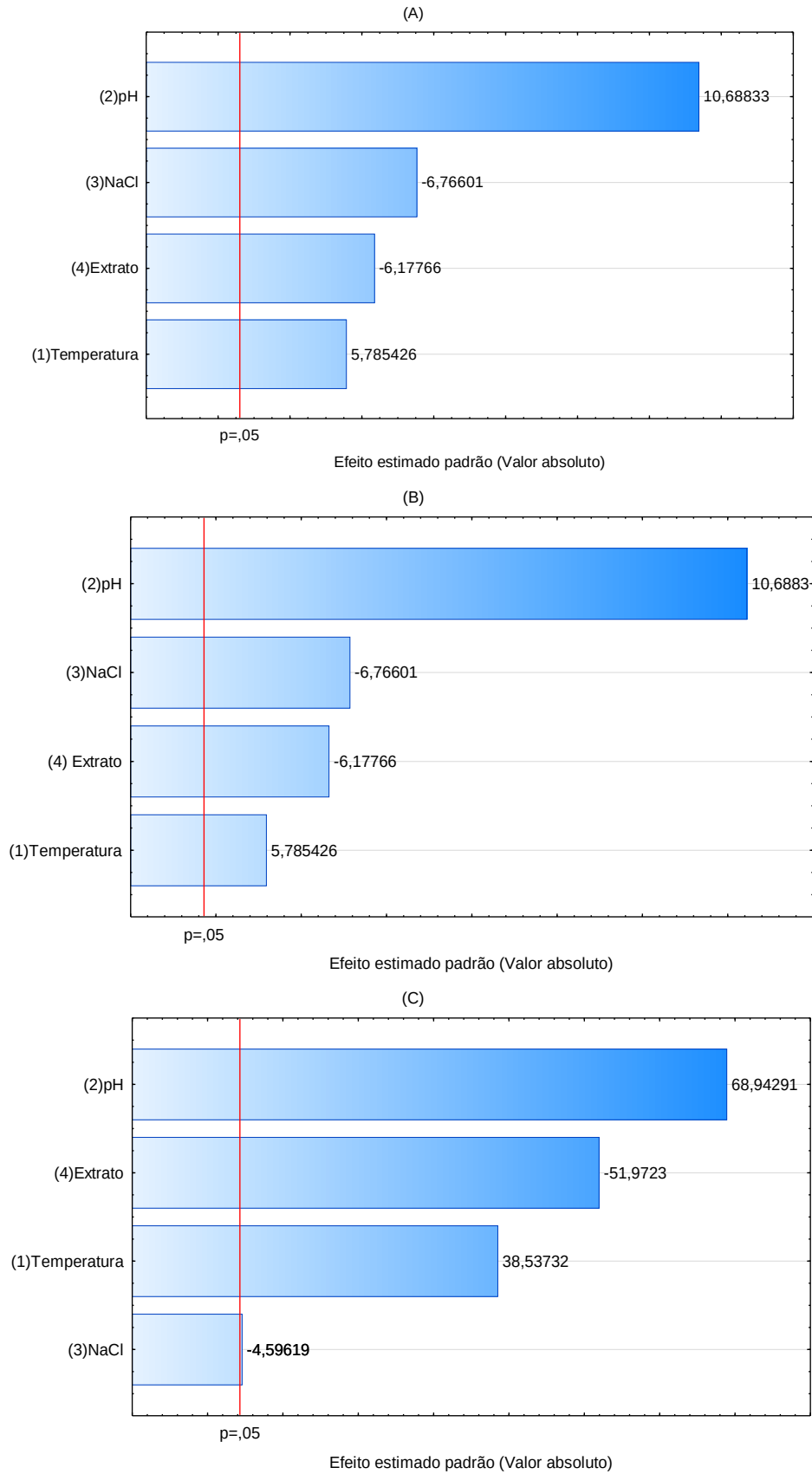
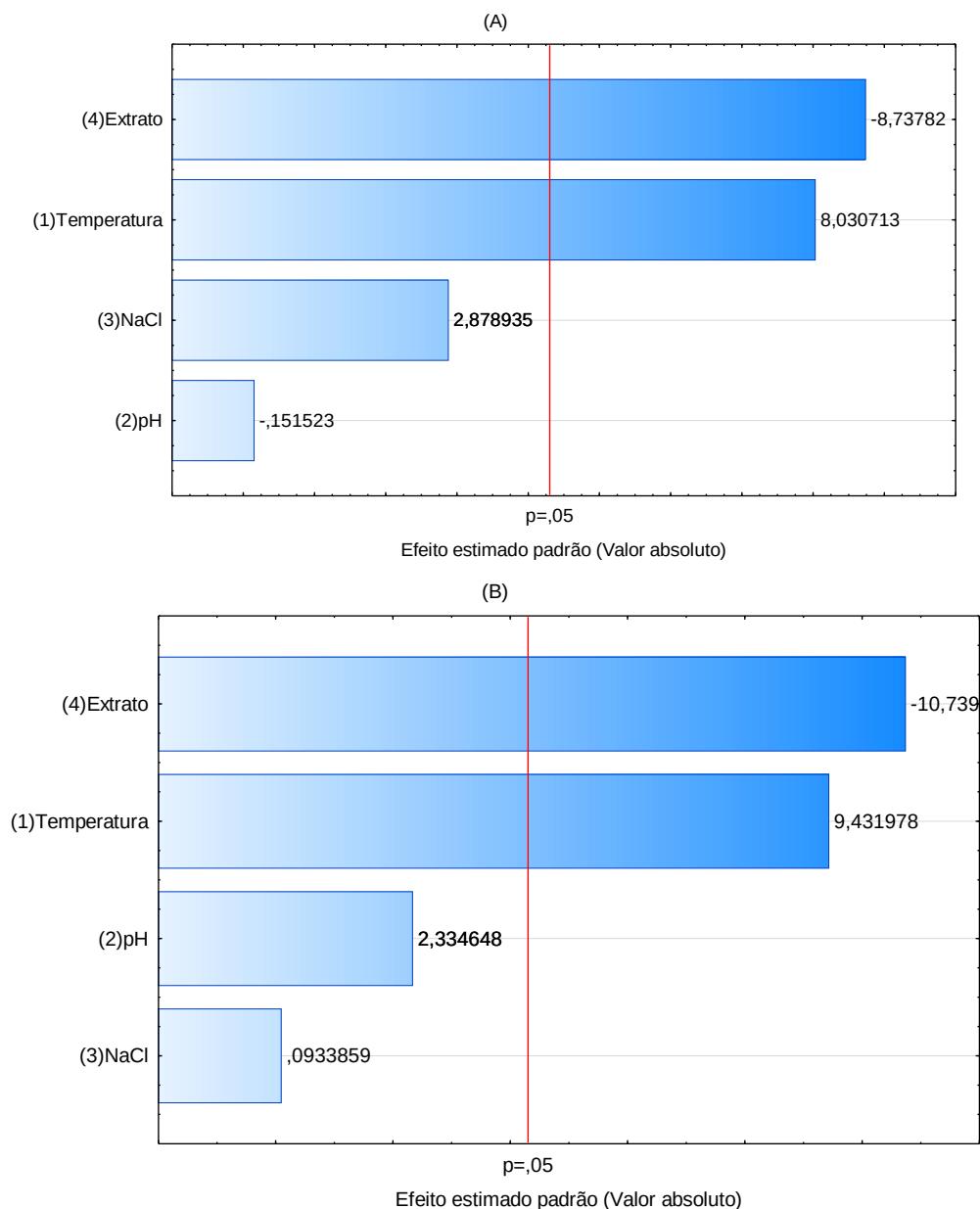


Figura 13. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de casca de tamarindo frente a velocidade de crescimento do (A) *S. aureus*, (B) *S. Enteritidis*.



O efeito do pH, temperatura, concentração de NaCl e concentração do extrato de semente de tamarindo no crescimento das bactérias foi avaliado estatisticamente e os resultados estão demonstrados na Figura 14 e 15.

Para o *B. subtilis* (Figura 14A), apenas o pH apresentou significância ($p < 0,05$), com efeito positivo. Ou seja, quanto maior o pH maior será a redução na taxa de crescimento. Contudo, para a *P. aeruginosa* nenhum parâmetro foi significativo para inibição deste microrganismo (Figura 14B).

Avaliando o efeito para o *E. faecalis* (Figura 15A), todos os parâmetros, com exceção do NaCl, apresentaram efeitos significativos a um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), com efeito maior observado para o pH, quanto maior o valor maior será a taxa de inibição.

Para o crescimento do patógeno *S. aureus* (Figura 15B), apenas o extrato da semente de tamarindo e o pH apresentaram efeito significativo. Tendo o extrato da semente apresentado o maior efeito, sendo quanto menor a concentração do extrato maior será a taxa de inibição.

Já para a *S. Enteritidis* (Figura 15C), todos os parâmetros influenciaram estatisticamente ($p < 0,05$) a inibição.

Figura 14. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de semente de tamarindo frente a velocidade de crescimento do (A) *B. subtilis*, (B) *P. aeruginosa*.

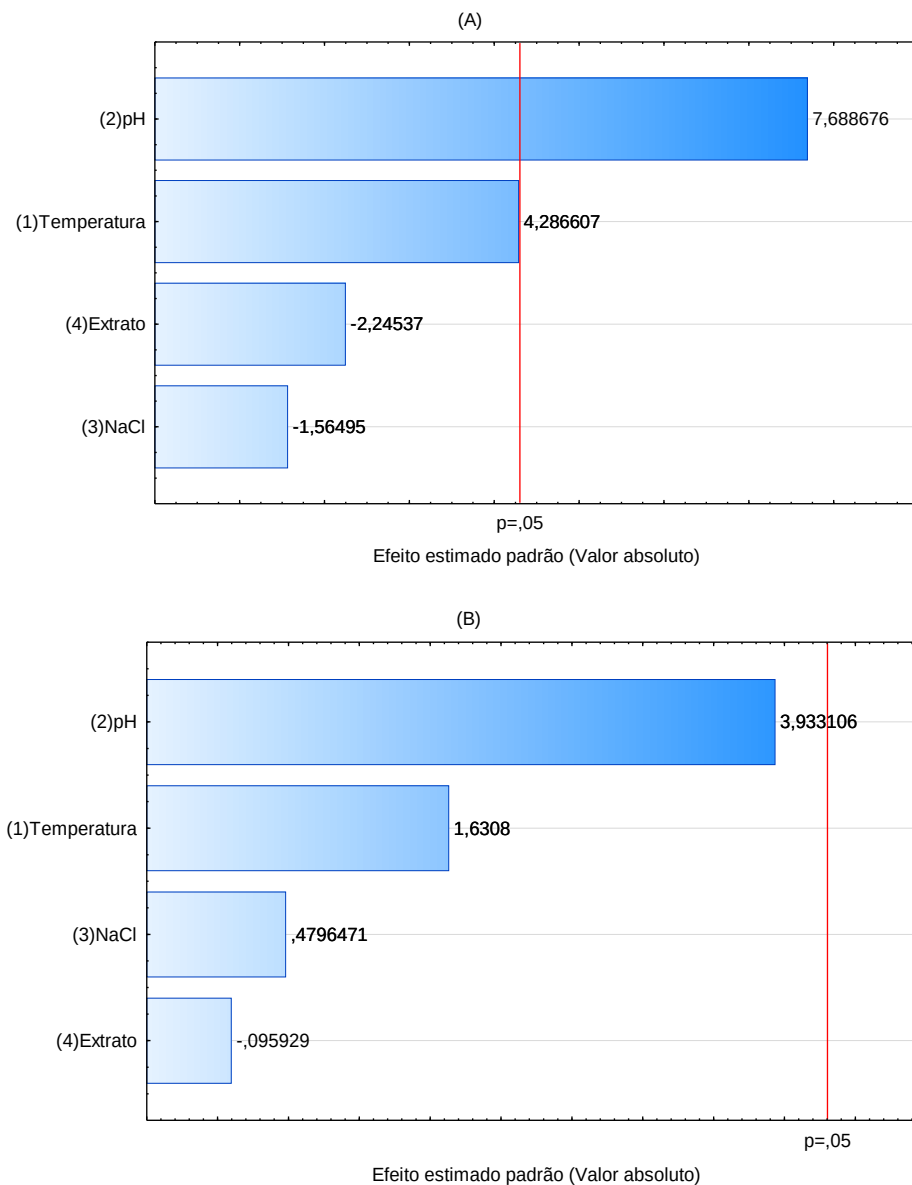
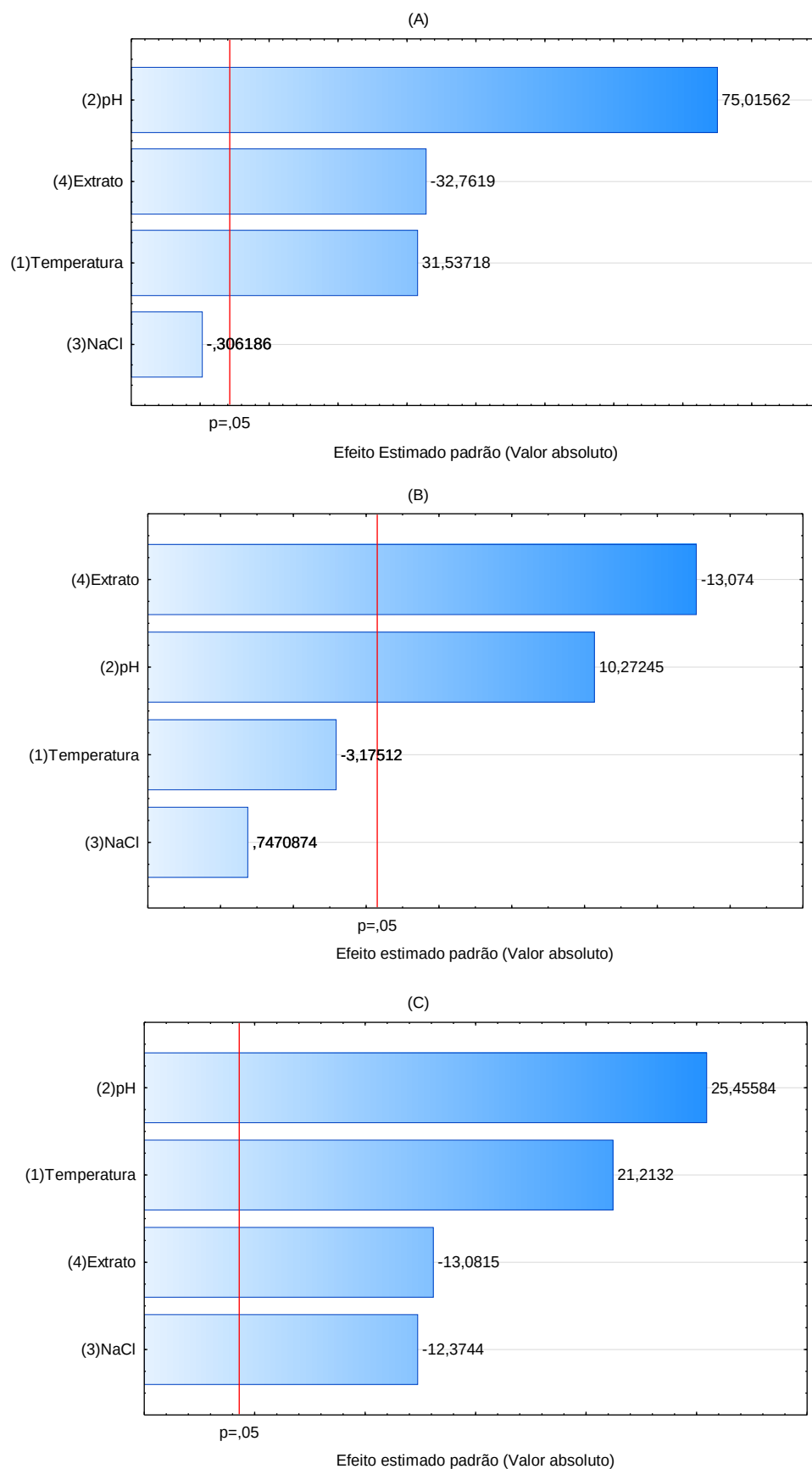


Figura 15. Diagrama de Pareto dos efeitos da temperatura, pH, NaCl e extrato de semente de tamarindo fren a velocidade de crescimento do (A) *E. faecalis*, (B) *S. aureus*, (C) *S. Enteritidis*.



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho cinco bactérias foram incubadas em diferentes condições de pH, temperatura, concentração de cloreto de sódio e concentração de extrato em etanol 80% de casca ou de sementes de tamarindo segundo o planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} mais 3 pontos centrais. O modelo de Baranyi e Roberts foi ajustado aos dados experimentais e foram determinados o tempo da fase lag e a taxa máxima de crescimento de cada bactéria.

As bactérias foram mais sensíveis às condições onde utilizou-se meio de cultivo contendo extrato de casca do que de sementes de tamarindo.

Através dos gráficos de Pareto, verificou-se que temperatura, pH, concentração de sal e de extrato da casca de tamarindo foram significativos para a inibição de *B. subtilis*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. Já o extrato da casca foi o parâmetro mais significativo para a inibição de *S. aureus* e *S. Enteritidis*. Por outro lado, quando usado meio de cultivo contendo extrato de sementes de tamarindo, o pH foi o parâmetro que mais influenciou a inibição do *B. subtilis*, *E. faecalis* e *S. Enteritidis*. Já o extrato da semente foi mais significativo para a inibição de *S. aureus* e para a *P. aeruginosa* nenhum parâmetro influenciou a inibição.

Neste estudo foi possível obter os parâmetros preditivos, tempo de fase lag e velocidade máxima de crescimento microbiano, importantes para avaliar o efeito do pH, temperatura, concentração de sal e concentração de extrato da casca ou da semente de tamarindo no crescimento ou inibição de bactérias patogênicas de alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELSKOV, J.; PATEL, B. K. C. A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies *stecoris* strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2016.

AGUIRRE, J. S.; RODRÍGUEZ, M. R.; FERNANDO, G. D. G. Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 236-246, 2011.

AKKERMANS, S.; NIMMEGEERS, P.; IMPE, J. F. A tutorial on uncertainty propagation techniques for predictive microbiology models: A critical analysis of state-of-the-art techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 282, p. 1-8, 2018.

BALAMURUGAN, S.; BALU, A. R.; USHARANI, K.; SUGANYA, K.; ANITHA, S.; PRABHA, D.; ILANGO VAN, S. Synthesis of CdO nanopowders by a simple soft chemical method and evaluation of their antimicrobial activities. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**, v. 18, p. 228-232, 2016.

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

BOLÍVAR, W.M.; BENÍTEZ, L. P. T.; AVILÉS, C. A. N.; PÉREZ, D. D. L. Evaluation of the *in vitro* toxicity of green magnetic nanoparticles using *Caenorhabditis elegans* as a biological model. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 12, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 192-SEI/2017-CGDT/DEVIT/SVS/MS e Sistema Informação de Agravos de Notificação (Sinan). 13 de dezembro de 2017. Comunicação Pessoal Brasília, 2017, 242p. [Acesso 20 jul 2017]. Disponível em: http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/balanco_2016_perspectivas2017_web.pdf.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); (2008) CLSI; [document M100-S18].

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Balanço 2016, perspectiva 2017.

COUVERT, O.; GUEGAN, S.; HEZARD, B.; HUCHET, V.; LINTZ, A.; THUAULT, D.; STAHL, V. Modeling carbon dioxide effect in a controlled atmosphere and its interactions with temperature and pH on the growth of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. **Food Microbiology**, v. 68, p. 89-96, 2017.

DEBNATH, S.; RAHMAN, S. M. H.; DESHMUKH, G.; DUGANATH, N.; PRANITHA, C.; CHIRANJEEVI, A. Antimicrobial Screening of Various Fruit Seed Extracts. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p. 83- 86, 2011.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GANESAPILLAI, M.; VENUGOPAL, A.; SIMHA, P. Preliminary isolation, recovery and characterization of polyphenols from waste *Tamarindus indica* L. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, p. 10658-10661, 2017.

GHAFFARIPOUR, S.; BILCKE, N. V. den.; SAMSON, R. The importance of seed reserve on performance and breeding of tamarind seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 222, p. 145-152, 2017.

GONÇALVES, L. D. A. et al. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 352-358, 2017.

GONZÁLEZ, S. C. et al. 'MicroHibro': A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, p. 226-236, 2019.

HABERBECK, L. U.; RODRÍGUEZ, C. P.; DESVIGNES, V.; DALGAARDA, P.; SANAAC, M.; GUILLIERC, L.; NAUTAA, M.; FILTER, M. Harmonized terms, concepts and metadata for microbiological risk assessment models: The basis for knowledge integration and Exchange. **Microbial Risk Analysis**, v. 10, p. 3-12, 2018.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. N. Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, p. 1-6, 2018.

HUANBUTTA, H.; YUNSIR, A.; SRIAMORNSAK, P.; SANGNIM, T. Development and *in vitro/in vivo* evaluation of tamarind seed gum-based oral disintegrating tablets after fabrication by freeze drying. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, 2019.

HUANG, L. IPMP Global Fit- A one step direct data analysis tool for predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, n. 4, p. 38-48, 2017.

ILIADIS, I.; DASKALOPOULOU, A.; SIMÕES, M.; GIAOURIS, E. Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by *Salmonella enterica* ser. Enteritidis and Typhimurium under low nutrient food-related conditions. **Food Research International**, v. 107, p. 10-18, 2018.

KANG, I. B. et al. Heat resistance of *Salmonella* Enteritidis under prolonged exposure to acid-salt combined stress and subsequent refrigeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, n. February, p. 165–172, 2018.

KAVUNCUOGLU, H.; KAVUNCUOGLU, E.; KARATASC, S. M.; BENLIA, B.; SAGDIC, O.; YALCIN, H. Prediction of the antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) kernel aqueous extracts using artificial neural network and multiple linear regression. **Journal of Microbiological Methods**, v. 148, p. 78-86, 2018.

KRISHNAN, K. R.; BABUSKIN, R.; BABU, P., A., S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Evaluation and predictive modeling the effects of spice extracts on raw chicken meat stored at different temperatures. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 29-37, 2015.

KURU, P. *Tamarindus indica* and its health related effects. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 676-681, 2014.

LIU, F. et al. Effect of NaCl Treatments on Tyramine Biosynthesis of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 5, p. 940–945, 1 maio 2015.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N.; Antioxidant activity, fatty acid profile and tocopherols of *Tamarindus indica* L. seeds. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.2, p. 497- 501, 2011.

MESSENS, W.; HEMPEN, M.; KOUTSOUMANIS, K. Use of predictive modelling in recente work of the Panel on Biological Hazards of the European Food Safety Authority. **Microbial Risk Analysis**, v. 10, p. 37-43, 2018.

MOHAN, C. C.; HARINI, K.; AAFRIN, B. V.; PRIYA, U. L.; JENITA, P. M.; BABUSKIN, S.; KARTHIKEYAN, S.; SUKUMAR, M. Extraction and Characterization of polysaccharides from tamarind seeds, rice mill residue, okra waste and sugarcane bagasse for its Bio-thermoplastic properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 394-401, 218.

MURRAY, P. R. et al. Manual of clinical microbiology, 8th ed., ASM: Washington, 2003.

OLAGUNJU, O. F.; EZEKIEL, O. O.; OGUNSHE, A. O.; OYEYINKA, S. A.; IJABADENIYI, O. A. Effects of fermentation on proximate composition, mineral profile and antinutrients of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed in the production of daddawa-type condiment. **LWT**, v. 90, p. 455-459, 2018.

PAULA, F. S. et al. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. **Food and Chemical Toxicology**, Ribeirão Preto, v. 47, n. 1, p. 163-170, 2009.

POSSAS, A.; RODRÍGUEZ, F. P.; VALERO, A.; GIMENO, R. M.G. Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, n. 45-55, 2017.

RANGARAJ, V. M.; EDATHILA, A. A.; KANNANGARAB, Y. Y.; SONG, J. K.; HAIJAC, M. A.; BANAT, F. Tamarind shell derived N-doped carbon for capacitive deionization (CDI) studies. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 848, 2019.

RODRÍGUEZ, C. P.; HABERBECK, L. U.; DESVIGNES, V.; DALGAARD, P.; SANAA, M.; NAUTA, M.; FILTER, M.; GUILLIER, L. Towards transparent and consistent exchange of knowledge for improved microbiological food safety. **Food Safety**, v. 19, p. 129-137, 2018.

ROHLING, A. A.; ARTAIZ, A.; CALERO, S.; HALAIHEL, N.; GUILLÉN, S.; RASO, J.; ÁLVAREZ, I.; CEBRIÁN, G. Dataset on the use of the Ratkowsky model for describing the influence of storage temperature on microbial growth in hake fillets (*Merluccius merluccius*) stored under MAP. **Data in Brief**, v. 27, 2019.

RUBAB, M. et al. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p. 49–57, 2018.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. ;SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água, São Paulo, Varela, 2007.

SONG, X. et al. Failure of *staphylococcus aureus* to acquire direct and cross tolerance after habituation to cinnamon essential oil. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, 2019.

TAMPLIN, M. L. Integrating predictive models and sensors to manage food stability in supply chains. **Food Microbiology**, v. 75, p. 90-94, 2018.

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

TELEKEN, J . T.; GALVÃO, A. C.; ROBAZZA, W. S. Use of modified Richards model to predict isothermal and non-isothermal microbial growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 614-620, 2018.

TRILL, U. et al. Chemical, physicochemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of rich-fibre powder extract obtained from tamarind (*Tamarindus indica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 155-162, 2014.

VERCAMMEN, D. et al. Application of a dynamic metabolic flux algorithm during a temperature-induced lag phase. **Food and Bioproducts Processing**, v.102, p. 1-19, 2017.

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

YANG, Q. et al. Lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis* Y17 and *Pediococcus pentosaceus* G11, improved growth performance, and immunity of mud crab (*Scylla paramamosain*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 93, n. July, p. 135–143, 2019.

YE, B. et al. Response to Acid Adaptation in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 3, p. 599–605, 2019.

YÜZÜGÜLLÜ-KARAKUŞ, Y. et al. Endüstriyel enzimler üreten *Bacillus* izolatlarının morfolojik , biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu Morphological , biochemical and molecular characterization of *Bacillus*. v. 75, n. 4, p. 353–364, 2018.