

DANIELA ABRANTES LEAL

**EFEITO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SALSICHAS EMBALADAS A  
VÁCUO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L435e  
2018 Leal, Daniela Abrantes, 1993-  
Efeito da temperatura de armazenamento nas características físico-químicas e microbiológicas de salsichas embaladas a vácuo / Daniela Abrantes Leal. – Viçosa, MG, 2018.  
x, 56 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Salsichas - Deterioração. 2. Salsichas - Armazenamento - Efeito da temperatura. 3. Bactérias lácticas. 4. Organismos psicrotópicos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.9297

DANIELA ABRANTES LEAL

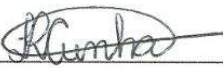
**EFEITO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NAS CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SALSICHAS EMBALADAS A  
VÁCUO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de outubro de 2018.

  
Nélio José de Andrade

  
Monique Renon Eller

  
Luciana Rodrigues da Cunha

  
Regina Célia Santos Mendonça  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que de forma espetacular guiou meus passos, cuidou dos meus sonhos e meu deu forças para alcançar a vitória.

À minha orientadora Regina Célia Santos Mendonça, pela orientação, e confiança. À minha coorientadora Monique Renon Eller, pelo carinho e orientação. A professor Nélio José de Andrade, pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Umberto e Raquel pelo amor incondicional, pelas orações constantes que tanto me abençoam, por terem me apoiado em todos os momentos desta caminhada, por acreditarem na minha capacidade e pelos laços de amor eternos. Sem vocês este sonho não se tornaria realidade. Aos meus avós, Pedro e Estela, Sara e Vasco, pelo amor e pelas orações.

À minha irmã, Débora, pelo amor e amizade ao longo da vida, pelos conselhos e ensinamentos. Você é meu orgulho!

Ao meu namorado, Fernando, pelo carinho, companhia, compreensão e principalmente pelo amor dado. Sem você, minha caminhada não seria tão feliz como foi.

À minhas amigas, Mariana e Paula, pela amizade, cumplicidade e momentos de descontração.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso. Aos funcionários e técnicos do DTA pelo apoio e disposição em ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Nubiomol UFV, em especial a Pedro, pela essencial ajuda com a análise dos dados.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) e do DTA pela amizade e pelas trocas de conhecimento, em especial, Jéssica, Lucas, Luana, Nélio, Maria Paulina, Nayara, Beatriz, Taliny, Camila, Pedro.

A todos os meus verdadeiros amigos pelo apoio, amizade e companheirismo. E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para eu chegar até aqui,

os meus sinceros agradecimentos.

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1. Objetivo geral .....	2
2.2. Objetivos específicos .....	2
CAPÍTULO 1 .....	3
1. DEFINIÇÕES, CLASSIFICAÇÃO E PADRÕES MICROBIOLÓGICOS DE SALSICHAS .....	3
2. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE SALSICHAS .....	5
3. VIDA ÚTIL DE SALSICHA .....	8
4. MICROBIOTA DETERIORADORA DE PRODUTOS CÁRNEOS .....	9
4.1. Bactérias do ácido láctico (BAL) .....	10
4.2. <i>Brochothrix thermosphacta</i> .....	11
4.3. <i>Pseudomonas</i> spp. ....	11
4.4. <i>Clostridium</i> spp. sulfito redutores .....	12
5. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO APLICADO À MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS .....	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
CAPÍTULO 2 .....	18
1. INTRODUÇÃO .....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
2.1. Coleta e armazenamento das amostras .....	20
2.2. Outros materiais .....	20
2.3. Preparo das amostras .....	20
2.4. Análises microbiológicas .....	21
2.4.1. Contagem de Bactérias lácticas .....	21
2.4.2. Contagem de psicrotróficos .....	21
2.4.3. Contagem de <i>Clostridium</i> sulfito redutores .....	21
2.4.4. Contagem de fungos filamentosos e leveduras .....	21
2.5. Análises físicas e químicas .....	22
2.5.1. Acidez total titulável .....	22

2.5.2.	Atividade de água.....	22
2.5.3.	Análise instrumental da cor.....	22
2.5.4.	Desprendimento da embalagem.....	23
2.6.	Análises estatísticas.....	24
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1.	Crescimento microbiano.....	24
3.2.	Acidez total titulável e Atividade de água.....	28
3.3.	Desprendimento da embalagem.....	30
3.4.	Análise Instrumental da cor.....	31
4.	CONCLUSÃO.....	32
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 3.....		38
1.	INTRODUÇÃO.....	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1.	Coleta das amostras.....	40
2.2.	Determinação do pH.....	40
2.3.	Extração de DNA total.....	41
2.4.	Sequenciamento.....	42
2.5.	Análise dos dados de sequenciamento.....	42
2.6.	Análises estatísticas.....	43
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
3.1.	Análise metagenômica das amostras.....	43
3.2.	Análise comparativa dos metagenomas das salsichas.....	46
3.3.	Sucessão bacteriana nas salsichas.....	49
4.	CONCLUSÃO GERAL.....	52
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	56

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO 1**

Tabela 1: Quantidade máxima permitida de ingredientes em salsichas.....	4
Tabela 2: Padrão microbiológico sanitário para salsichas.....	5

### **CAPÍTULO 2**

Tabela 1: Modelo de regressão ajustado os dados de multiplicação bacteriana em salsichas embaladas a vácuo ao longo do tempo.....	25
---	----

### **CAPÍTULO 3**

Tabela 4: Organismos e sua ocorrência nas amostras de DNA total sequenciadas.....	42
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1:

Figura 1: Fluxograma da produção de salsichas.....6

### CAPÍTULO 2:

Figura 1: Preparo das salsichas para a análise instrumental da cor.....22

Figura 2: Esquema utilizado para quantificar o desprendimento da embalagem.....23

Figura 3: Multiplicação de bactérias do ácido lático e de psicrotróficos em salsichas embaladas a vácuo armazenadas a 5 °C (o) e a 15 °C (●) durante 60 d.....24

Figura 4: Limo superficial observado a partir do vigésimo dia em salsichas armazenadas a 15°C.....26

Figura 5: Comportamento da acidez total titulável das salsichas armazenadas a 5 °C (o) e 15 °C (●) em função do tempo.....28

Figura 6: Atividade de água das salsichas armazenadas a 5 °C (o) e 15 °C (●) em função do tempo.....29

Figura 7: Desprendimento da embalagem de salsichas armazenadas a 5 °C (o) e 15 °C (●) em função do tempo.....29

### CAPÍTULO 3:

Figura 1: Gêneros bacterianos pertencentes ao filo Firmicutes observados nas amostras (A) e espécies do grupo de bactérias do ácido lático (B) presentes nas amostras de salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 5 °C e a 15 °C.....43

Figura 2: Gráfico de dispersão bidimensional dos componentes principais para as temperaturas de armazenamento 5 °C (T5) e 15 °C (T15).....45

Figura 3: Gráfico de dispersão bidimensional dos componentes principais para os diferentes lotes de fabricação (L1 e L2).....45

Figura 4: Contagens de sequências bacterianas desconhecidas presentes nas amostras.....46

Figura 5: Sucessão microbiana e pH nas salsichas armazenadas a 15 °C.....47

Figura 6: Sucessão microbiana e pH nas salsichas armazenadas a 5 °C.....48

## RESUMO

LEAL, Daniela Abrantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2018. **Efeito da temperatura de armazenamento nas características físico-químicas e microbiológicas de salsichas embaladas a vácuo.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça.

Carnes e produtos cárneos possuem características como atividade de água elevada e pH próximo da neutralidade que favorecem a multiplicação bacteriana, o que contribui para a sua rápida deterioração em poucos dias, dependendo das condições de armazenamento. A perda de produtos cárneos por deterioração é problema comumente enfrentado pelas indústrias e por consumidores. Diversos fatores como a qualidade da matéria-prima, condições higiênicas durante o processamento, condições de embalagem e distribuição são relevantes e influenciam no prazo de vida útil de um produto cárneo. Abusos na temperatura de armazenamento aceleram a ocorrência de uma série de reações químicas e bioquímicas no produto, que se torna deteriorado e impróprio para consumo em pouco tempo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento (5 e 15 °C) na estabilidade e na composição da microbiota bacteriana de salsichas embaladas a vácuo durante a sua vida útil. Salsichas coletadas diretamente na linha de processamento e provenientes de três lotes foram armazenadas a 5 ou 15 °C e analisadas ao longo de 60 d quanto à presença de bactérias do ácido láctico (BAL), psicrotróficos, Clostridium sulfito redutores, fungos filamentosos e leveduras. Avaliou-se também ao longo do tempo a acidez total titulável (ATT), pH, atividade de água (Aa), desprendimento da embalagem (perda de vácuo) e cor das salsichas. Além disso, procedeu-se ao longo dos 60 d, a extração de DNA bacteriano total, para sequenciamento e identificação das espécies que compunham a microbiota das salsichas. A ATT aumentou de 0,13 para 0,26 %, a Aa se manteve praticamente constante (~0,98), o pH foi de 6,4 para 5,9 e o desprendimento da embalagem de 0 para 86 % ao longo dos 60 d nas salsichas armazenadas a 5 °C. Nas salsichas armazenadas a 15 °C a ATT aumentou em quase cinco vezes, a Aa se manteve estável em ~0,98, o pH foi de 6,4 para 5,2 e o desprendimento da embalagem de 0 para 100 %. O aumento da ATT é vista como um indicativo da multiplicação bacteriana nas amostras, especialmente de BAL, que teve sua população aumentada em aproximadamente 7 log nas salsichas armazenadas a 15 °C e em 6 log naquelas armazenadas a 5 °C. A população de psicrotróficos teve aumento de 7,2 log nas salsichas armazenadas a 15 °C e de 6,8 ciclos log nas salsichas a 5 °C. Não foram observados Clostridium sulfito redutores (< 10 UFC·g<sup>-1</sup>), bem como fungos filamentosos e leveduras (< 100 UFC·g<sup>-1</sup>). A cor das salsichas não se alterou ao longo do tempo, independente da temperatura. Sinais macroscópicos de deterioração como

limosidade e odor desagradável foram observados apenas nas salsichas armazenadas a 15 °C que alcançaram números populacionais elevados ( $10^8$  UFC·g<sup>-1</sup>) mais rapidamente do que as armazenadas a 5 °C. *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* e *Lactococcus lactis* foram predominantes em ambas as condições de armazenamento. Além da predominância de BAL, grandes quantidades de DNA de soja e uma significativa porção (68,2 %) de sequências genômicas de bactérias ainda desconhecidas foram detectadas no sequenciamento. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as microbiotas dos lotes e entre as microbiotas das salsichas armazenadas sob diferentes temperaturas. O produto em estudo possui um prazo de validade longo (60 d) dentro do qual foram observadas alterações importantes, mesmo quando armazenado sob temperatura ideal, o que reforça a importância do controle das condições de armazenamento para a conservação desse tipo de produto cárneo.

## ABSTRACT

LEAL, Daniela Abrantes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2018. **Effect of storage temperature on the physico-chemical and microbiological characteristics of vacuum-packed sausages.** Advisor: Regina Célia Santos Mendonça.

Meat and meat products have characteristics such as high water activity and pH close to neutrality that favors bacterial multiplication and contributes to spoilage in few days, depending on the storage conditions. Meat products losses by spoilage is a problem commonly faced by the industries and by consumers. Several factors as raw material quality, hygienic conditions during manufacturing, packing and distribution conditions are relevant and influences on the shelf life of a meat product. Abusive storage temperatures accelerates several chemical and biochemical reactions in the product, which becomes spoiled and inappropriate to consumption in a short period. The goal of this study was evaluate the effect of different storage temperatures (5 and 15 °C) on the stability and on the sausages' bacterial microbiota composition during its shelf life. Sausages directly collected from the manufacturing process and from three different lots were stored under 5 or 15 °C and analysed throughout 60 days for presence of lactic acid bacteria (LAB), psychrotrophics, *Clostridium* sp., mold and yeast. Was too evaluated throughout this period the total titrable acidity (TTA), pH, water activity ( $A_w$ ), detachment of the packaging (vacuum loss) and the color of the sausages. Besides that, over the 60 days was proceeded total bacterial DNA extraction to sequencing and identification of the species that composed sausages microbiota. The TTA increased from 0,13 to 0,26 %, the  $A_w$  remained constant (~0,98), pH was from 6,4 to 5,9 and the detachment of the packaging was from 0 to 86 % over the 60 days in the sausages stored at 5 °C. On the sausages stored at 15 °C the TTA increased almost five times,  $A_w$  remained stable in ~0,98, pH was from 6,4 to 5,2 and the detachment of the packaging was from 0 to 100 %. The TTA increase is an indicative of bacterial multiplication on the samples, especially LAB, which had an increase of 7 log on its population in the sausages stored at 15 °C and of 6 log on that stored at 5 °C. Psychrotrophics population had an increase of 7,2 log on the sausages stored at 15 °C and of 6,8 log in the sausages at 5 °C. *Clostridium* sp. ( $< 10$  CFU·g<sup>-1</sup>) were not observed, as well molds and yeasts ( $< 100$  UFC·g<sup>-1</sup>). Sausages color didn't change over the time, independent of the temperature. Macroscopic signs of spoilage as slime and off flavor were observed only in the sausages stored at 15 °C, which reached high populational numbers ( $10^8$  CFU·g<sup>-1</sup>) faster than that stored at 5 °C. *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* e *Lactococcus lactis* were predominant in both storage conditions. Besides LAB prevailing, a big amount of soy DNA and a significant portion

(68,2 %) of yet unknown bacteria genomic sequences were detected through sequencing. There was no difference ( $p > 0,05$ ) between lots microbiotas and between the microbiotas of the sausages stored at different temperatures. The studied product has a log shelf life (60 days) in which it were observed important changes, even when stored under an ideal temperature, what reinforce the importance of the storage conditions control to the preservation of this kind of meat product.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Cerca de 974,7 mil toneladas de carne suína e 3,35 milhões de toneladas de carne de frango foram produzidas em 2017 no Brasil. Embora o consumo per capita anual de carne suína no Brasil, de 15 Kg, seja considerado baixo, a maior parte da produção nacional é destinada ao mercado interno, já que apenas 20 % da produção brasileira de carne suína é exportada (ABPA, 2016). Além da carne in natura, produtos cárneos processados, produzidos a partir de carne suína e de aves, também são amplamente consumidos pela população brasileira, especialmente presunto, mortadela e salsichas (MESQUITA et al., 2018). O elevado consumo de produtos cárneos chama a atenção das indústrias e desperta o interesse de produção em larga escala para que se possa atender às demandas de mercado com um menor custo de produção e consequentemente, melhores lucros.

Além de suprir a demanda do mercado consumidor, a produção em larga escala enfrenta desafios para garantir a qualidade e segurança microbiológica dos produtos cárneos processados, os quais constituem, de modo geral, matrizes favoráveis à multiplicação microbiana (pH próximo à neutralidade, grande disponibilidade de nutrientes, atividade de água elevada). Diversos fatores como a qualidade microbiológica da matéria-prima, condições de processamento e de estocagem, tipo de embalagem, atividade de água final do produto são críticos para a garantia da qualidade e segurança microbiológica dos produtos cárneos. Esses fatores, por si só, ou a sua combinação resultam em alterações na cor, textura, sabor do produto e consequentemente, na rejeição do produto. A temperatura de armazenamento é um dos principais fatores relacionados à garantia da qualidade e segurança microbiológica de produtos cárneos. Muitas vezes, durante a distribuição no varejo o produto é submetido a temperaturas abusivas, o que compromete sua qualidade uma vez que produtos cárneos em sua maioria, necessitam armazenamento a baixas temperaturas, geralmente 0 a 5 °C. (MOHAREB et al., 2015; ZHOU, XU, & LIU, 2010; BORGES & FREITAS, 2002;).

A deterioração de alimentos, de modo geral, é um processo heterogêneo e complexo que envolve várias comunidades bacterianas conhecidas e também desconhecidas. A deterioração microbiana de produtos cárneos é responsável por uma quantidade significativa de perdas de alimentos no mundo inteiro. Estas perdas por deterioração têm impacto econômico, social e ambiental na sociedade e por isso, motivam a realização de estudos que busquem compreender melhor os fenômenos envolvidos e desenvolver métodos que objetivem reduzir estas perdas (WU et al., 2018; NYCHAS et al., 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da temperatura de armazenamento nas características físico-químicas e microbiológicas de salsichas embaladas a vácuo.

### **2.2. Objetivos específicos**

- i.** Avaliar as alterações físico-químicas em salsichas embaladas a vácuo armazenadas a 5 °C e 15 °C ao longo de 60 dias.
- ii.** Avaliar se o armazenamento em diferentes temperaturas promove a alteração na diversidade bacteriana das salsichas.
- iii.** Conhecer a sucessão microbiana nas salsichas embaladas a embaladas a vácuo armazenadas a 5 °C e 15 °C ao longo de 60 dias.

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. DEFINIÇÕES, CLASSIFICAÇÃO E PADRÕES MICROBIOLÓGICOS DE SALSICHAS

De acordo com o Anexo IV do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salsicha da Instrução Normativa Nº 4, de 31 de março de 2000 (BRASIL, 2000), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), “salsicha é o produto cárneo industrializado obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue (estômago, coração, língua, rins, miolos, fígado), tendões, pele e gorduras, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural, artificial ou por processo de extrusão, submetido a um tratamento térmico adequado e podem ter como processos alternativos o tingimento, a depelagem, a defumação e a utilização de recheios e molhos” (BRASIL, 2000).

A matéria-prima da salsicha, conforme o anexo IV da Instrução Normativa Nº 4 (BRASIL, 2000), é “composta de carne de diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separadas, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue, tendões, pele, gordura, além de ingredientes opcionais como água, proteína vegetal e/ ou animal, agentes de liga, aditivos intencionais, açúcares, aromas, especiarias e condimentos”. Para cada ingrediente são permitidos os limites máximos no produto (Tabela 1).

**Tabela 1:** Quantidade máxima permitida de ingredientes em salsichas.

<b>Ingrediente</b>	<b>Limite máximo (% m/ m)</b>
<b>Carne mecanicamente separada</b>	60
<b>Miúdos comestíveis e gorduras</b>	10
<b>Proteína não animal</b>	4
<b>Amido</b>	2
<b>Gordura</b>	30
<b>Água</b>	10
<b>Carboidratos totais</b>	7

Fonte: BRASIL, 2000.

O principal componente cárneo das salsichas é a carne mecanicamente separada (CMS). Entende-se por Carne Mecanicamente Separada a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue, destinada à elaboração de produtos

cárneos específicos. Após a separação mecânica a carne é congelada em blocos (BRASIL, 2000; GONÇALVES et al., 2009).

De acordo com a composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação usadas, diferentes tipos de produtos podem ser elaborados e são classificados em (BRASIL, 2001):

**Salsicha** - Carnes de diferentes espécies de animais de açougue, carnes mecanicamente separadas até o limite máximo de 60 %, miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue (estômago, coração, língua, rins, miolos, fígado), tendões, pele e gorduras.

**Salsicha Tipo Viena e Tipo Frankfurt** - Carnes bovina e/ ou suína e carnes mecanicamente separadas até o limite máximo de 40 %, miúdos comestíveis de bovino e/ ou suíno (estômago, coração, língua, rins, miolos, fígado), tendões, pele e gorduras.

**Salsicha Viena** -Porções musculares de carnes bovina e/ ou suína e gordura, podendo ser defumada.

**Salsicha Frankfurt** - Porções musculares de carnes bovina e/ ou suína e gorduras. Se diferencia da salsicha Viena por ser, geralmente, mais temperada e incluir bacon ou toucinho em sua composição.

**Salsicha de Carne de Ave** - Carne de ave e carne mecanicamente separada, no máximo de 40 %, miúdos comestíveis de ave e gorduras.

Visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos, a RDC N° 12 (BRASIL, 2001) cita os micro-organismos de interesse sanitário para produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não, onde se encaixam as salsichas. Na Tabela 2, estão descritos os padrões microbiológicos para salsicha, de acordo com esta legislação.

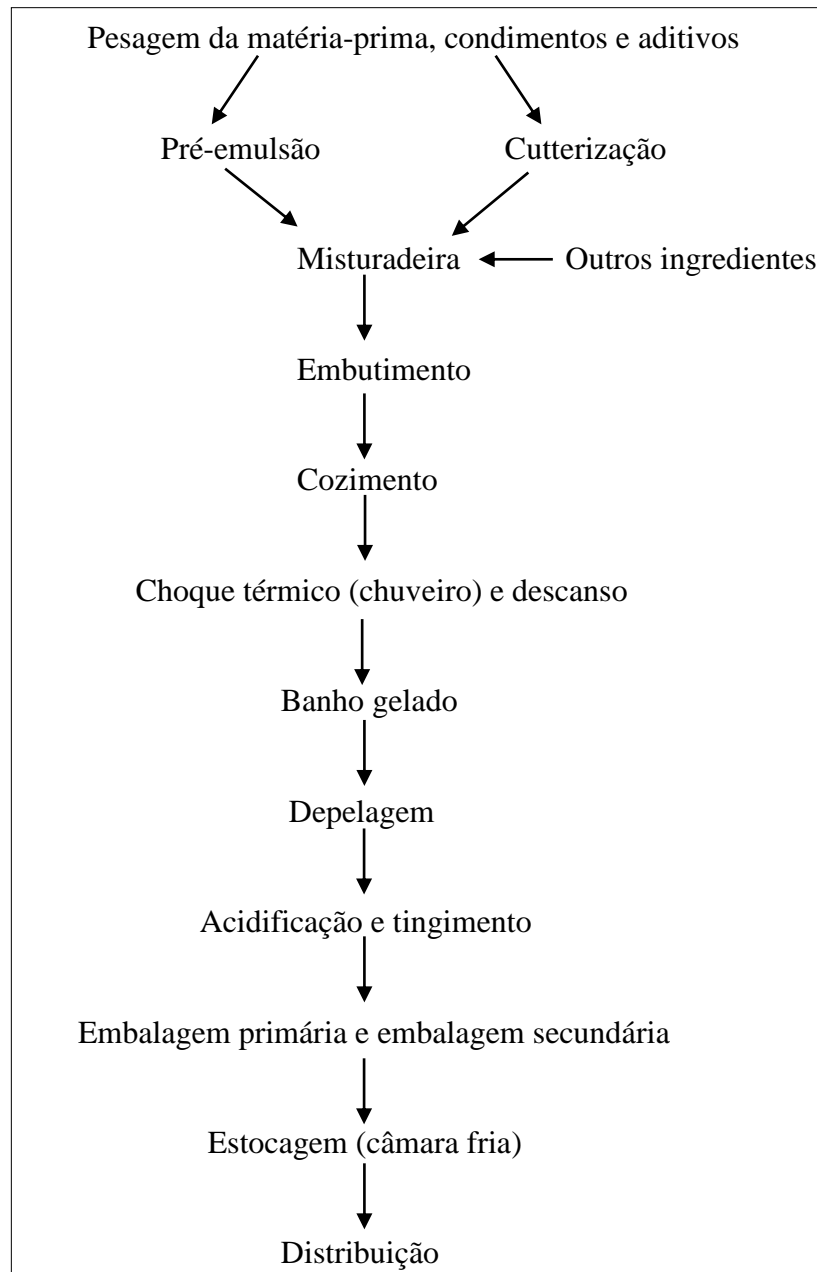
**Tabela 2:** Padrão microbiológico para salsichas.

Micro-organismo	Tolerância para amostra indicativa (UFC·g <sup>-1</sup> )	Tolerância para amostra representativa (UFC·g <sup>-1</sup> )			
		n	c	m	M
<b>Coliformes a 45 °C</b>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	5	2	1,0 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>
<b>Staphylococcus sp. coagulase positivo</b>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	5	1	1,0 x 10 <sup>2</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>
<b>Salmonella sp.</b>	Ausente/ 25 g	5	0	-	-
<b>Clostridium sp. sulfito redutor a 46 °C</b>	5,0 x 10 <sup>3</sup>	5	1	1,0 x 10 <sup>2</sup>	5,0 x 10 <sup>2</sup>

Fonte: BRASIL, 2001.

## 2. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE SALSICHAS

Previamente à coleta das amostras para este estudo, realizou-se o acompanhamento do processo de produção das salsichas na indústria. A produção (Figura 1) se inicia com o recebimento e pesagem dos aditivos e ingredientes, e após isso, o bloco de carne congelada é quebrado com o auxílio de um quebrador de blocos. As carnes utilizadas na fabricação de salsicha devem estar congeladas (-5 °C a 2 °C), de forma a facilitar o controle de temperatura no cutter, onde ocorre a trituração da carne. Durante a cutterização, temperaturas baixas (inferiores a 16 °C) contribuem para evitar a desnaturação das proteínas e evitam a liquefação da gordura.



**Figura 1:** Etapas da produção de salsichas embaladas a vácuo.

Paralelo à cutterização é preparada a pré-emulsão. Na pré-emulsão, gelo, pele suína cozida e parte da proteína são triturados e reservados, para na etapa seguinte, serem misturados à carne cutterizada. Em seguida as massas formadas na pré-emulsão e cutterização são adicionadas à misturadeira, seguido da adição dos condimentos e demais ingredientes. Na misturadeira, a massa é mantida sob movimentação constante, o que contribui para uma melhor homogeneização. Ao final desta etapa, a massa pronta é transferida para as embutideiras.

Na operação de embutimento de salsichas são utilizados envoltórios artificiais, de calibre de 22 mm. O envoltório é torcido (equipamento mecânico de torção) para que se formem

gomos de 9 a 12 cm de comprimento. Os gomos são colocados em varas, e estas em gaiolas, para serem transportadas para as estufas de cozimento.

Na etapa de cozimento objetiva-se obter características sensoriais do produto final (cor, sabor e consistência), estabilizar a mistura e melhorar a conservação da salsicha. O cozimento das salsichas pode ser feito em estufas (calor seco) ou cozimento a vapor (calor úmido). As gaiolas são colocadas dentro da estufa, onde a temperatura deve permanecer a 70 °C por 30 min. Passado esse tempo, a temperatura é aumentada para 80 °C durante 15 min.

Com o cozimento a 65 a 70 °C, as proteínas da carne são coaguladas e a gordura é estabilizada, isto é, a emulsão é estabilizada por um determinado período de tempo. O cozimento promove uma redução da carga microbiana do produto, o que irá depender do binômio tempo/ temperatura utilizado. Após o cozimento, o manuseio adequado e a estocagem sob refrigeração são essenciais para prevenir a recontaminação e retardar o crescimento de micro-organismos termorresistentes que tenham sobrevivido no produto.

Após o cozimento, as salsichas passam por um choque térmico promovido por um banho de água fria (chuveiro) até que sua temperatura interna atinja cerca de 40 °C. Após o choque térmico as gaiolas com as salsichas são retiradas do chuveiro e passam pelo descanso. Em seguida, as salsichas são imersas em um banho de gelo (2 °C) para que a temperatura do produto alcance cerca de 15 °C.

A depelagem ocorre apenas para produtos embutidos com tripa artificial e que tenham passado por cozimento. Este processo, que consiste na remoção do envoltório sintético utilizado para embutir a emulsão, ocorre em um equipamento no qual ajusta-se a lâmina de modo a cortar a tripa da forma mais precisa possível, evitando cortes no produto.

Após a depelagem as salsichas são levadas a um banho em tanque de tingimento com corante. Em seguida, elas passam por tanque contendo ácido láctico para garantir a fixação da cor. O corante utilizado para o tingimento é o extrato de urucum, e o pigmento bixina é responsável pela coloração alaranjada conferida ao produto.

As salsichas podem ser colocadas manualmente ou automaticamente nas embalagens e seladas a vácuo. Os materiais usados como embalagem primária podem variar, podendo ser Nylon/ Polietileno; PVdC/ Nylon/ Polietileno ou outros que sejam capazes de manter o vácuo na embalagem.

Após a embalagem primária, os pacotes de salsicha são condicionados em caixas de papelão (embalagem secundária) e mantidas em câmaras de resfriamento (5 – 7) °C ou congelamento, caso o produto seja para exportação.

### **3. VIDA ÚTIL DE SALSICHA**

A salsicha é um alimento muito consumido e de fácil preparo. Entretanto, se manipulada de maneira inadequada, pode se tornar uma excelente fonte de contaminação e proliferação de micro-organismos (SUKUMARAN et al., 2018). Quando comercializadas a granel, as salsichas tem sua vida útil reduzida em função da exposição ao ambiente, aumentando o risco de contaminação e deterioração. Vida útil é definida o como o tempo em que o alimento pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa e luz, passando por alterações que são até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (CORRADINI, 2018).

O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2017), em seu artigo 497, cita: “Consideram-se impróprios para o consumo humano, na forma em que se apresentam, no todo ou em parte, as matérias-primas ou os produtos de origem animal que: apresentem-se alterados, fraudados; danificados por umidade ou fermentação, rançosos, com características físicas ou sensoriais anormais, contendo quaisquer sujidades ou que demonstrem pouco cuidado na manipulação, na elaboração, na conservação ou no acondicionamento; que contenham substâncias ou contaminantes que não possuam limite estabelecido em legislação, mas que possam prejudicar a saúde do consumidor; contenham substâncias tóxicas ou compostos radioativos em níveis acima dos limites permitidos em legislação específica; contenham micro-organismos patogênicos em níveis acima dos limites permitidos; apresentem embalagens estufadas, defeituosas e com seu conteúdo exposto à contaminação e à deterioração, etc” (BRASIL, 2017).

Nos embutidos, os micro-organismos alteradores podem se multiplicar sobre a superfície do envoltório, entre o envoltório e a carne ou no seu interior. Várias espécies de bactérias são capazes de se multiplicar no interior dos embutidos durante o período de armazenamento. Os micro-organismos e/ ou seus produtos metabólicos, em determinadas quantidades, são indicadores da qualidade do alimento e estão diretamente relacionados com o prazo de vida útil dos mesmos (RUKCHON et al., 2014).

A deterioração causa alterações físicas, químicas ou sensoriais, isto é, alterações na cor, odor, textura, sabor, ou aparência, como consequência da atividade metabólica dos micro-

organismos presentes (TAVARES & SERAFINI, 2003), e ocorre basicamente de três formas: viscosidade, acidificação e manchas verdes.

Franco e Landgraf (2008) destacam os principais e mais comuns defeitos em salsichas durante a sua vida útil:

- Liberação de líquido: resultado do desequilíbrio entre os teores de água, gordura e proteínas solúveis. Esse líquido liberado pode possibilitar o desenvolvimento de micro-organismos, o que contribui para a deterioração do produto.
- Manchas verdes: o esverdeamento é o resultado do desenvolvimento de micro-organismos que produzem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que, ao reagir com o nitrosohemocromo (Eq. 01), pigmento responsável por conferir cor rósea-avermelhada às salsichas, produz coeglobina, pigmento de cor verde (Eq. 02).



- Perda de vácuo ou estufamento da embalagem: pode decorrer da presença de microfuros na termosoldagem ou do desenvolvimento de bactérias lácticas heterofermentativas que, ao produzirem gás carbônico, provocam a perda do vácuo.
- Limosidade superficial: é um líquido viscoso formado, geralmente, exopolímeros produzidos por bactérias.
- A acidificação ocorre normalmente na parte interna do envoltório das carnes processadas e é resultado do crescimento de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e micro-organismos relacionados. A acidez resulta da utilização de açúcares pelos micro-organismos com a produção de ácidos.

Os tipos de deterioração variam de acordo com as condições do micro-ambiente que envolvem os produtos e com a temperatura de armazenamento.

#### **4. MICROBIOTA DETERIORADORA DE PRODUTOS CÁRNEOS**

Cada etapa da cadeia de produção de alimentos é parte integrante na segurança alimentar, desde o campo até a mesa do consumidor. Os contaminantes dos produtos cárneos são originados, principalmente, da própria matéria-prima. A contaminação da carne pode acontecer em diferentes fases da obtenção da matéria-prima, desde a recepção dos animais até etapas como a sangria e evisceração (ROUGER, TRESSE, & ZAGOREC, 2017). Fatores

intrínsecos e extrínsecos favorecem o crescimento microbiano em salsichas e demais produtos cárneos, sendo alguns destes: alta atividade de água; pH favorável para a maioria dos micro-organismos e elevado teor de nutrientes (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Alguns micro-organismos tipicamente envolvidos na deterioração dos derivados cárneos são *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter moraxella*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochotrix thermosphacta*, *Lactobacillus* spp. e algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, além de leveduras e fungos filamentosos. Condições inadequadas de higiene dos manipuladores e do ambiente favorecem a contaminação por estes micro-organismos (DE ALCANTARA et al., 2012).

#### **4.1. Bactérias do ácido láctico (BAL)**

As BAL constituem um heterogêneo grupo de cocos ou bacilos gram-positivos e anaeróbios facultativos, sem motilidade, catalase-negativos e que produzem ácido láctico como principal produto final da fermentação de carboidratos (RAMÍREZ et al., 2011). Estas bactérias possuem alta tolerância a pH baixos, o que confere vantagem competitiva em determinados ambientes. BAL podem ser isoladas a partir de alimentos, mas também a partir do trato digestivo de mamíferos. Para sua multiplicação, estes micro-organismos requerem fontes de carbono como glicose e lactose além de aminoácidos, vitaminas e outros fatores de crescimento (RAMÍREZ et al., 2011; WATERS et al., 2015).

Bactérias deste grupo são frequentemente identificadas como a maior população deteriorante em produtos embalados a vácuo e em atmosfera modificada, além de outros produtos cárneos processados armazenados sob temperatura de refrigeração. Sob anaerobiose, provocam modificações nestes produtos como o aumento da acidez, formação de limo, perda da coloração e, devido à produção de gás, podem ainda provocar estufamento e a perda de vácuo da embalagem (SAMELIS, KAKOURI, & REMENTZIS, 2000).

O processo de deterioração de um alimento por BAL inicia-se pela fermentação de açúcares, resultando na formação de ácido láctico e limo superficial, o que provoca uma queda de pH e alteração de cheiro e de sabor. Em condições de anaerobiose, como no caso de carnes e produtos cárneos embalados a vácuo a deterioração se inicia com a acidificação. Alterações na qualidade sensorial do alimento são causadas pelo acúmulo de produtos resultantes da atividade metabólica das BAL que, neste ambiente, dominam a microbiota e atingem populações numerosas (POTHAKOS et al., 2015; FANG et al., 2017).

Doulgeraki e colaboradores (2010) relataram que as condições de armazenamento, temperatura e embalagem a vácuo têm um efeito importante na diversidade da população microbiana e aumentam o potencial de deterioração pelas BAL.

Os gêneros de BAL mais comumente identificadas em produtos cárneos são *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* spp. Algumas espécies heterofermentativas como *Lactobacillus viridescens* podem produzir peróxidos que reagem com os pigmentos da carne e causam o esverdeamento (NATTRESS, YOST & BAKER, 2001). *L. sakei* é considerada a BAL mais resistente a baixas temperaturas, comumente associada a carne fresca e à deterioração de vários produtos cárneos embalados em vácuo ou em atmosfera protetora (ERCOLINI et al., 2006).

#### **4.2. *Brochothrix thermosphacta***

*Brochothrix thermosphacta* é um bacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo que utiliza a glicose como substrato principal. Já foi conhecido como *Microbacterium thermosphactum*. Este bacilo constitui, com frequência, uma proporção significativa da microbiota de deterioração da carne e produtos cárneos armazenados em aerobiose, em atmosferas protetoras ou em vácuo, em ambientes refrigerados (NEWTON, HARRISON & SMITH, 1977).

O metabolismo de *B. thermosphacta* resulta na produção de acetoína, ácido acético, ácido isobutírico e ácido isovalérico (DAINTY & HIBBARD, 1980). O sinal mais relevante de deterioração em carnes por *B. thermosphacta* é o odor agridoce associado principalmente com a produção de acetoína e, em menor escala, com os ácidos restantes produzidos (PIN, DE FERNANDO & ORDOÑEZ, 2002). Em condições de anaerobiose, como nas embalagens a vácuo, este micro-organismo utiliza a glicose produzindo ácido lático e os odores detectados são descritos como azedos (PIN, DE FERNANDO & ORDOÑEZ, 2002). *B. thermosphacta* pode atuar como micro-organismo dominante, especialmente se a atmosfera e o pH (> 6) forem favoráveis ao seu crescimento (DAINTY & HIBBARD, 1980).

#### **4.3. *Pseudomonas* spp.**

*Pseudomonas* são bactérias bastonetes gram-negativas, aeróbias, móveis, não fermentativas, produtoras de pigmentos hidrossolúveis e quase sempre encontradas na microbiota normal intestinal e cutânea humana (TAVARES & SERAFINI, 2003). São reconhecidas como importantes deterioradoras de produtos cárneos armazenados sob refrigeração e em condições de aerobiose.

Diferentes espécies de *Pseudomonas* são relatadas na literatura como psicrotróficas devido a sua habilidade em se multiplicar e em produtos cárneos armazenados sob refrigeração e contribuir para a sua deterioração (CASABURI et al., 2015; ERCOLINI et al., 2009). Uma vez presentes, elas colonizam, se multiplicam e promovem a formação de limo e mau odor, comprometendo a qualidade do produto. *Pseudomonas* sp. colonizam o ambiente de processamento formando biofilmes que se comportam como disseminadores destas bactérias para os produtos (NYCHAS et al., 2008; CASABURI et al., 2015; POTHAKOS et al., 2015; STELLATO et al., 2017). Em alimentos com alta atividade de água mantidos sob refrigeração e condições aeróbias, como é o caso de muitos produtos cárneos, *P. alcaligenes* é comumente referida como responsável pela formação de limo superficial.

Quando o produto cárneo é embalado a vácuo ou é usada uma atmosfera modificada com mais de 20 % de CO<sub>2</sub>, o crescimento de *Pseudomonas* spp. é suprimido e sob estas condições as BAL crescem mais rapidamente (JABERI, KABAN, & KAYA, 2018).

#### **4.4. Clostridium spp. sulfito redutores**

Espécies do gênero *Clostridium* são, com exceção de alguns aerotolerantes, anaeróbias estritas e catalase negativas. *Clostridium* spp. podem ser encontrados no solo, trato intestinal do homem e de animais, podem ser mesófilos ou termófilos, proteolíticos ou não proteolíticos. Dentre as espécies mesófilas proteolíticas responsáveis pela putrefação de diversos tipos de alimentos estão: *C. putrefaciens*, *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. botulinum* e *C. lentoputrecens*, as quais são produtoras de toxinas causadoras de intoxicações alimentares (FRAZIER & WESTHOFF, 1993).

Algumas espécies do gênero *Clostridium* (*C. gasigenes*, *C. algidicarnis*, *C. tagluense*, *C. frigidicarnis* and *C. estertheticum*) têm sido reportadas como psicrotróficos deterioradores de produtos cárneos embalados a vácuo, promovendo excessivo acúmulo de gás e mau cheiro, além da perda de cor e textura da carne (BONKE, DREES, & GAREIS, 2016; REID et al., 2017; BRIGHTWELL & HORVÁTH, 2018).

## **5. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO APLICADO À MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS**

A década de 90 marcou o início da transição da genética para a genômica, com o desenvolvimento de métodos de sequenciamento automatizados que se baseavam no método de sequenciamento dideoxi ou sequenciamento de Sanger conhecidos como sequenciamentos de primeira geração. Com o aumento do poder das ferramentas computacionais, o rendimento

desse método de sequenciamento aumentou ainda mais, possibilitando o sequenciamento do genoma de organismos com pouca ou nenhuma informação prévia disponível (HAMILTON & BUELL, 2012; MARDIS, 2008).

Nos últimos anos novas estratégias de sequenciamento, referidas como sequenciamento de nova geração (NGS), vem sendo desenvolvidas. As técnicas de NGS são ditas como de alto rendimento uma vez que produzem milhares e até milhões de sequências, as quais são usadas para a identificação acurada de um micro-organismo, incluindo os não cultiváveis e aqueles presentes em baixo número (MAYO et al., 2014).

O resultado do sequenciamento corresponde a milhões de pequenos pedaços de DNA (chamados de reads, com dezenas ou centenas de pares de bases) e sem identificação de qual organismo este DNA foi extraído. Atualmente a plataforma Illumina é a mais utilizada para NGS, produzindo reads com comprimentos que variam de 25 a 600 bases em uma velocidade maior e custos mais baixos do que o sequenciamento de Sanger. Dado o comprimento reduzido dos reads obtidos por essa tecnologia, seu uso na montagem de genomas demanda a utilização de coberturas maiores. O aumento da cobertura de sequenciamento, ao compensar esta redução, permite a obtenção de conjuntos de dados de alta qualidade, com taxas de erro pequenas ( $\sim 10^{-16}$ ), considerando que cada nucleotídeo tenha sido confirmado pelo menos oito vezes por reads idênticos (cobertura mínima de 8x) (SCHATZ, WITKIWSKI & MCCOMBIE, 2012; SIMS et al., 2014).

Métodos independentes de cultivo surgiram para superar as limitações da abordagem clássica baseada no cultivo de micro-organismos e vêm sendo amplamente utilizados na microbiologia de alimentos com o intuito de se estudar a ocorrência e o comportamento dos micro-organismos. As populações microbianas em alimentos merecem atenção devido à sua importância no que se refere a contaminações, deterioração e até mesmo produção de alimentos, como no caso de fermentados (ERCOLINI, 2013). Ercolini e colaboradores (2011) puderam, a partir de um sequenciamento do metagenoma, observar que a microbiota inicial de uma carne bovina mudou drasticamente após o armazenamento por 40 dias em diferentes condições de embalagem.

O estudo de alimentos como microbiomas implica na análise de amplicons gerados de um conjunto de genomas extraídos da amostra de produto. Os amplicons são sequenciados e as sequências são comparadas com uma base de dados referência para que se possa fazer a identificação taxonômica. Embora tenha limitações, como o alto custo, o sequenciamento de

alto rendimento tem sido reconhecido como uma ferramenta muito útil para estudos de microbiomas de alimentos (ERCOLINI, 2013).

Compreender como a microbiota evolui ao longo do tempo é uma prioridade no estudo da ecologia microbiana dos alimentos. As mudanças nas populações microbianas fornecem informações úteis para entender, por exemplo, a dinâmica de uma fermentação natural, monitorar culturas starters, e até mesmo observar mudanças nas populações associadas à deterioração de acordo com as condições de armazenamento de alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. Relatório anual 2016. Disponível em: < [http://abpa-br.com.br/storage/files/versao\\_final\\_para\\_envio\\_digital\\_1925a\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web1.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf) >. Acesso em 20 de Agosto de 2018.
- BONKE, R., DREES, N., & GAREIS, M. Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 1, 7 p. 2016.
- BORGES, J. T. D. S.; FREITAS, A. S. Aplicação do Sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça, de salsicha. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, abril, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9013. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 de março de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.
- BRIGHTWELL, G.; HORVÁTH, K. M. Molecular discrimination of New Zealand sourced meat spoilage associated psychrotolerant *Clostridium* species by ARDRA and its comparison with 16s RNA gene sequencing. **Meat science**, v. 138, p. 23-27, 2018.
- CASABURI, A.; PIOMBINO, P.; NYCHAS, G. J.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. **Food Microbiology**, v. 45, p. 83-102, 2015.
- CORRADINI, M. G. Shelf Life of Food Products: From Open Labeling to Real-Time Measurements. **Annual review of food science and technology**, v. 9, p. 251-269, 2018.

- DAINTY, R. H.; HIBBARD, C. M. Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 48, p. 387-396, 1980.
- DE ALCANTARA, M.; DE MORAIS, I. C. L.; DE MATOS, C.; DE SOUZA, O. D. C. C. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 6, n. 1, p. 1-20, 2012.
- DOULGERAKI, A.; PARAMITHIOTIS, S.; KAGKLI, D.; NYCHAS, G. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1028–1034, 2010.
- ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; NASI, A.; FERRANTI, P.; VILLANI, F. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1990-2001, 2009.
- ERCOLINI, D. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 10, p. 3148-3155, 2013.
- ERCOLINI, D.; FERROCINO, I.; NASI, A.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; LA STORIA, A.; LAGHI, L.; MAURIELLO, G.; GUERZONI, M. E.; VILLANI, F. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored in different packaging conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, p. 7372–7381, 2011.
- ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; TORRIERI, E.; MASI, P.; VILLANI, F. Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4663–4671, 2006.
- FANG, Z.; ZHAO, Y.; WARNER, R. D.; JOHNSON, S. K. Active and intelligent packaging in meat industry. **Trends in food science & technology**, v. 61, p. 60-71, 2017.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, p. 93-98, 2008.
- GONÇALVES, R. M.; GONÇALVES, J. R.; GONÇALVES, R. M.; DE OLIVEIRA, R. R.; DE OLIVEIRA, R. A.; LAGE, M. E. Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada (CMS) de frango e de bovino produzidas no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 553-559, 2009.
- HAMILTON, J. P.; ROBIN BUELL, C. Advances in plant genome sequencing. **The Plant Journal**, v. 70, n. 1, p. 177–190, 2012.
- HENTGES, D.; ZART, N.; MARMITT, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; ADAMI, F. S. Concentrações de nitrito e nitrato em salsichas. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 27-33, 2016.
- JABERI, R.; KABAN, G.; KAYA, M. Effects of vacuum and high-oxygen modified atmosphere packaging on physico-chemical and microbiological properties of minced water buffalo meat. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 2018.

- MARDIS, E. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 9, p 387-402, 2012.
- MARTINS, L. L.; DOS SANTOS, L. F.; FRANCO, R. M.; DE OLIVEIRA, L. A. T.; BEZZ, J. Determinação de pH e atividade de água (Aa) e sua inter-relação com o perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói – RJ. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2/3, p. 92–96, 2011.
- MAYO, B.; TCC RACHID, C.; ALEGRÍA, Á.; MO LEITE, A.; S PEIXOTO, R.; DELGADO, S. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. **Current genomics**, v. 15, n. 4, p. 293-309, 2014.
- MESQUITA, E.; PETRUCI, J. F.; CARDOSO, A. A.; MONTEIRO, M. Capillary electrophoresis to approach sorbate usage in processed meat products in Brazil. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 1, 443-447, 2018.
- MOHAREB, F.; IRIONDO, M.; DOULGERAKI, A. I.; VAN HOEK, A.; AARTS, H.; CAUCHI, M.; NYCHAS, G. J. E. Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. **Food Control**, v. 57, p. 152-160, 2015.
- NATTRESS, F. M.; YOST, C. K.; BAKER, L. P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p.111-119, 2001.
- NEWTON, K. G.; HARRISON, J. C. L.; SMITH, K. M. The Effect of Storage in Various Gaseous Atmospheres on the Microflora of Lamb Chops Held at -1 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 43, p. 53–59, 1977.
- NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat science**, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, 2008.
- PIN, C.; DE FERNANDO, G. D. G.; ORDOÑEZ, J. A. Effect of Modified Atmosphere Composition on the Metabolism of Glucose by *Brochothrix thermosphacta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4441–4447, 2002.
- POTHAKOS, V.; DEVLIEGHERE, F.; VILLANI, F.; BJÖRKROTH, J.; ERCOLINI, D. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat science**, v. 109, p. 66-74, 2015.
- RAMÍREZ, J. C. R.; ULLOA, P. R.; GONZÁLEZ, M. Y. V.; ULLOA, J. A.; ROMERO, F. A. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, v. 2, n. 7, 16 p., 2011.
- REID, R., BURGESS, C. M., MCCABE, E., FANNING, S., WHYTE, P., KERRY, J., & BOLTON, D. Real-time PCR methods for the detection of blown pack spoilage causing *Clostridium* species; *C. estertheticum*, *C. gasigenes* and *C. ruminantium*. **Meat science**, v. 133, p. 56-60, 2017.

- RODRIGUES, A.; LADEIRAS, F.; LEITÃO, L. Análise de Mercado de Alimentos e Bebidas Baseada em Pesquisa de Campo e Estratégia de Marketing. **Revista Carioca de Produção**, v. 2, 24 p., 2009.
- ROUGER, A.; TRESSE, O.; ZAGOREC, M. Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, 16 p., 2017.
- RUKCHON, C.; NOPWINYUWONG, A.; TREVANICH, S.; JINKARN, T.; SUPPAKUL, P. Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. **Talanta**, v. 130, p. 547-554, 2014.
- SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329-340, 2000.
- SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 465-477, 1999.
- SCHATZ, M. C.; WITKIWSKI, J.; MCCOMBIE, W. R. Current challenges in de novo plant genome sequencing and assembly. **Genome biology**, v. 13, n. 4, p. 1-7, 2012.
- SIMS, D.; SUDBERY, I.; ILOTT, N. E.; HEGER, A.; PONTING, C. P. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. **Nature Reviews**, v. 15, n. 2, fevereiro, 2014.
- STELLATO, G.; UTTER, D. R.; VOORHIS, A.; DE ANGELIS, M.; EREN, A. M.; ERCOLINI, D. A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. 264, 9 p., 2017.
- SUKUMARAN, A. T.; HOLTCAMP, A. J.; ENGLISHBEY, A. K.; CAMPBELL, Y. L.; KIM, T.; SCHILLING, M. W.; DINH, T. T. Effect of deboning time on the growth of *Salmonella*, *E. coli*, aerobic, and lactic acid bacteria during beef sausage processing and storage. **Meat science**, v. 139, p. 49-55, 2018.
- TAVARES, T. M.; SERAFINI, A. B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo “trailers” em Goiânia (GO). **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 1, p. 45-52, 2003.
- WATERS, D. M.; MAUCH, A.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K.; ZANNINI, E. Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal-based beverages: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 4, p. 503-520, 2015.
- WU, S.; XU, S.; CHEN, X.; SUN, H.; HU, M.; BAI, Z.; ZHUANG, G.; ZHUANG, X. Bacterial Communities Changes during Food Waste Spoilage. **Scientific reports**, v. 8, n. 8220, 2018.
- ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat—A review. **Meat science**, v. 86, n. 1, p. 119-128, 2010.

## CAPÍTULO 2

### EFEITO DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SALSICHAS EMBALADAS A VÁCUO

#### RESUMO

Salsichas cozidas embaladas a vácuo são produtos que requerem armazenamento sob refrigeração, pois se deterioram rapidamente devido às suas características favoráveis à multiplicação bacteriana. Bactérias do ácido láctico (BAL) são o principal grupo bacteriano que compõe a microbiota desses produtos, sendo observadas desde o pós-fabricação e dominando até os tempos finais de vida útil. Nem sempre os produtos cárneos são armazenados nas condições recomendadas sendo, muitas vezes, submetido a temperaturas abusivas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento (5 e 15 °C) na estabilidade de salsichas embaladas a vácuo durante a sua vida útil. Salsichas embaladas a vácuo coletadas diretamente na linha de processamento e provenientes de três lotes foram armazenadas a 5 ou 15 °C e analisadas ao longo de 60 d quanto à presença de BAL, psicrotróficos, Clostridium sulfito redutores, fungos filamentosos e leveduras. Avaliou-se também a acidez total titulável (ATT), atividade de água (Aa), desprendimento da embalagem e cor das salsichas. Ao longo dos 60 d, as salsichas armazenadas a 5 °C tiveram a ATT aumentada de 0,13 para 0,26 %, enquanto a Aa se manteve praticamente constante (~0,98) e o desprendimento da embalagem foi de 0 para 86 % ao final do tempo de armazenamento. Nas salsichas armazenadas a 15 °C a ATT aumentou em quase cinco vezes, a Aa se manteve estável em ~0,98, e o desprendimento da embalagem foi de 0 para 100 %. O aumento da ATT é vista como um indicativo da multiplicação bacteriana, especialmente de BAL, que teve sua população aumentada em 7 log nas salsichas armazenadas a 15 °C e em 6 log nas salsichas armazenadas a 5 °C. Níveis populacionais similares aos de BAL foram observados para psicrotróficos, e os resultados indicam ser os psicrotróficos as próprias BAL. Não foram observados Clostridium sulfito redutores, bem como fungos filamentosos e leveduras. A cor das salsichas não se alterou ao longo do tempo, independente da temperatura. Sinais macroscópicos de deterioração como limosidade e odor desagradável foram observados apenas nas salsichas armazenadas a 15 °C que alcançaram números populacionais elevados de BAL ( $10^8$  UFC·g<sup>-1</sup>) mais rapidamente do que as armazenadas a 5 °C. A população de psicrotróficos teve aumento de 7,2 ciclos log nas salsichas armazenadas a 15 °C e de 6,8 ciclos log nas salsichas a 5 °C. O produto em estudo possui um prazo de validade longo (60 d) dentro do qual

foram observadas alterações importantes, mesmo quando armazenado sob temperatura ideal. O controle das condições de armazenamento é essencial para a conservação desse tipo de produto cárneo.

Palavras chave: produtos cárneos, bactérias do ácido lático, psicrotróficos, refrigeração, deterioração.

## **1. INTRODUÇÃO**

A deterioração de alimentos por micro-organismos é um dos maiores desafios enfrentados pelas indústrias de produtos cárneos. O aumento na demanda e a produção em larga escala significam, ao mesmo tempo, para a indústria, oportunidade de crescimento e o aumento da preocupação com processos de deterioração dos seus produtos e como estes podem ser controlados (SAUCIER, 2016).

Os produtos cárneos constituem matrizes favoráveis ao crescimento microbiano. A grande disponibilidade de nutrientes, a umidade elevada e pH próximo à neutralidade favorecem a presença, sobrevivência e multiplicação de ampla gama de micro-organismos, como as bactérias do ácido lático (BAL) e psicrotróficos como *Pseudomonas* sp. (JAYASENA & JO, 2013). A deterioração de produtos cárneos é um evento complexo que pode envolver diversas populações bacterianas e resultar em diferentes alterações físico-químicas na matriz do alimento. Estratégias como boas práticas de fabricação (BPF), embalagem a vácuo, armazenamento e distribuição sob baixas temperaturas são comumente utilizadas para retardar essas alterações do alimento (NYCHAS et al., 2008).

Flutuações na temperatura e temperaturas abusivas podem levar a alterações que comprometem a qualidade do produto (RUKCHON et al., 2014). Muitas vezes, a falta de controle durante a distribuição e armazenamento, no varejo e doméstico, dos alimentos perturba a cadeia do frio, tratada com seriedade pela indústria que preza por garantir a qualidade e segurança alimentar dos seus produtos (KOUTSOUMANIS & GOUGOULI, 2015).

Acompanhar a multiplicação bacteriana e as alterações físico-químicas em um produto de interesse é importante para que se possa conhecer como o alimento se altera diante de condições ideais e não ideais de armazenamento que, na prática, acontecem e devem ser consideradas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento (5 °C e 15 °C), uma considerada recomendada para o produto e outra, considerada abusiva, na estabilidade de salsichas embaladas a vácuo durante a vida útil do produto.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta e armazenamento das amostras**

As salsichas utilizadas neste estudo foram coletadas diretamente da linha de processamento. Cada lote foi composto de 24 pacotes de 450 g de salsichas embaladas a vácuo (10 salsichas por pacote), que foram armazenados sob a temperatura recomendada para o produto (5 °C) e outra considerada como abusiva (15 °C). As salsichas foram submetidos a análises microbiológicas (descritas no item 2.4), físicas e químicas (descritas no item 2.5) a cada cinco dias, desde o dia do processamento (tempo 0) até 60 d após a fabricação (tempo 12). O estudo foi conduzido coletando-se amostras de três lotes diferentes, sendo o primeiro de outubro de 2017, o segundo de janeiro de 2018 e o terceiro de fevereiro de 2018. As análises físico-químicas e microbiológicas foram conduzidas em triplicatas.

### **2.2. Outros materiais**

Todos os reagentes e meios de cultura foram utilizados sem nenhuma purificação adicional. Os meios de cultura utilizados foram All Purpose Tween (APT - Acumedia, EUA); Plate Count Agar (PCA – Difco, EUA); Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS– Merck, Alemanha) e Potato Dextrose Agar (PDA – HIMEDIA, Índia). Os reagentes utilizados foram NaCl (Labsynth, Brasil); Peptona (Himedia, Índia); Púrpura de bromocresol (Merck, Alemanha); Fenoltaleína (Merck, Alemanha) e Ácido tartárico (Merck, Alemanha).

A água para dissolução dos meios de cultura e preparo de soluções passou por sistema de purificação (Elix 35, Millipore, França) antes de ser utilizada.

### **2.3. Preparo das amostras**

Inicialmente, o exterior da embalagem foi higienizado com álcool 70 % (v/v) e, então, o pacote foi assepticamente aberto com o auxílio de uma faca esterilizada. Para a análise instrumental da cor foram reservadas duas salsichas inteiras. Para a análise de atividade de água reservou-se uma salsicha inteira. Para as demais análises (acidez total titulável e microbiológicas) as salsichas restantes foram assepticamente transferidas para um saco plástico esterilizado e trituradas, a fim de se obter uma massa uniforme da qual seriam tomadas as porções necessárias.

## **2.4. Análises microbiológicas**

Para as análises microbiológicas homogenatos foram preparados a partir de 25 g da massa de salsichas e 225 mL de solução salina (0,85 % m/ v) peptonada (0,1 % m/ v) esterilizada, e este conteúdo foi homogeneizado por 2 min (APHA, 2001).

Apesar de a RDC N° 12 (BRASIL, 2001), referência de padrões microbiológicos para alimentos, definir padrões sanitários, o que se propõe neste estudo é o estudo de micro-organismos tipicamente deterioradores de salsichas, não definidos na legislação brasileira, o que justifica a escolha de se avaliar diferentes grupos de micro-organismos não citados pela legislação.

### **2.4.1. Contagem de Bactérias láticas**

A contagem de BAL foi realizada por plaqueamento em profundidade e sobrecamada de ágar APT acrescido do indicador de pH púrpura de bromocresol na concentração de 0,004 % (m/ v) (APHA, 2001). As placas foram inseridas em jarras de anaerobiose (Permutation, Brasil) e incubadas a 30 °C por 48 h (APHA, 2001). Procedeu-se a contagem de colônias típicas (formato de grão de arroz e bordas amarelas) e os resultados foram expressos em UFC·g<sup>-1</sup>.

### **2.4.2. Contagem de psicotróficos**

Após preparadas as diluições seriadas, alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas na superfície de ágar PCA e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky esterilizada. Após a secagem do inóculo as placas foram incubadas a 7 ± 2 °C por 8 d (APHA, 2001). Procedeu-se a contagem de colônias e os resultados foram expressos em UFC·g<sup>-1</sup>.

### **2.4.3. Contagem de Clostridium sulfito redutores**

A contagem total de Clostridium spp. sulfito redutores foi realizada por meio de plaqueamento em profundidade (1 mL) e sobrecamada de ágar SPS (9 mL). As placas foram incubadas sob anaerobiose a 37 ± 1 °C por 48 h (APHA, 2001) e contadas, e os resultados foram expressos em UFC·g<sup>-1</sup>.

### **2.4.4. Contagem de fungos filamentosos e leveduras**

Foi feito plaqueamento por superfície em ágar PDA acrescido de 1,0 % (v/ v) de ácido tartárico (10 % m/ v). Alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas e espalhadas na superfície do ágar com o auxílio de uma alça de Drigalsky e após a secagem, as placas foram incubadas a 25 °C por 5 d (APHA, 2001). Procedeu-se a contagem de colônias e os resultados foram expressos em UFC·g<sup>-1</sup>.

## 2.5. Análises físicas e químicas

### 2.5.1. Acidez total titulável

Preparou-se um homogenato (5 g de massa de salsichas + 50 mL de água destilada) e três gotas de solução fenolftaleína a 1,0 % (m/v) foram adicionadas. Em seguida, procedeu-se a titulação com uma solução de hidróxido de sódio  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . O cálculo de acidez foi feito de acordo com a Eq. 1 (IAL, 2001).

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V \cdot f \cdot 100}{P \cdot c} \quad (1)$$

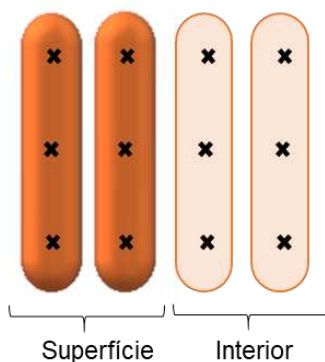
Onde, V = nº de mL da solução de hidróxido de sódio  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  gasto na titulação; f = fator da solução de hidróxido de sódio  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; P = massa da amostra usado na titulação (g); c = 100, valor de correção para solução de NaOH  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (IAL, 2001).

### 2.5.2. Atividade de água

A atividade de água das salsichas foi mensurada usando um analisador de bancada (4TE, Aqualab, Brasil), a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . As salsichas foram fracionadas em pedaços de  $0,5 \times 0,5 \times 0,5 \text{ cm}$ . Estas frações foram dispostas na cápsula do equipamento de modo que toda a superfície fosse preenchida com o material.

### 2.5.3. Análise instrumental da cor

Para determinar parâmetros relativos à cor das salsichas, foi utilizado um colorímetro portátil (CR-10, Konica Minolta, Japão) e o sistema de leitura utilizado foi o CIE (Commission Internationale de l'Eclairage)  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Duas salsichas de cada pacote amostral foram divididas ao meio, no sentido longitudinal, e dispostas em uma superfície plana, e as medidas de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  foram tomadas em três pontos (Figura 1) das superfícies interna e externa das amostras.



**Figura 1:** Preparo das salsichas para a análise instrumental da cor

No sistema CIE L\* a\* b\* o valor de L\* determina a posição no eixo vertical do diagrama de cromaticidade, representa a luminosidade da amostra e varia de 0 (preto puro) a 100 (branco puro). Em produtos cárneos, onde cores verdes e azuis não são comuns, o valor de a\*, ponto sobre o eixo que vai do verde (-) ao vermelho (+), determina o que é chamado de índice de vermelho, e o valor de b\*, que varia do azul (-) ao amarelo (+) determina o índice de amarelo (HERNÁNDEZ, 2016).

O cálculo do índice de saturação da cor (C\*) é a relação entre os valores de a\* e b\*, e define a intensidade da cor. O ângulo de tonalidade (h\*) formado entre a\* e b\*, permite definir a tonalidade da cor do objeto (JUNG et al., 2015).

As Eq. 2 e 3, foram utilizadas para os cálculos de C\* e h\*, respectivamente.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

$$h^* = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (3)$$

#### 2.5.4. Desprendimento da embalagem

À medida em que se observava perda de vácuo nas embalagens o filme plástico tornava-se desprendido das salsichas. Os pacotes de salsicha foram dispostos em uma bancada, e com o auxílio de uma régua, as medidas foram tomadas no ponto central do pacote. Media-se a altura do filme que não estava aderido às salsichas (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema utilizado para quantificar o desprendimento da embalagem.

O cálculo da porcentagem de desprendimento (Eq. 4) utilizou como referência 25 mm, isto é, a altura máxima observada na perda total do vácuo.

$$\text{Despredimento (\%)} = \frac{h}{25} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde h é a altura do filme não aderido às salsichas

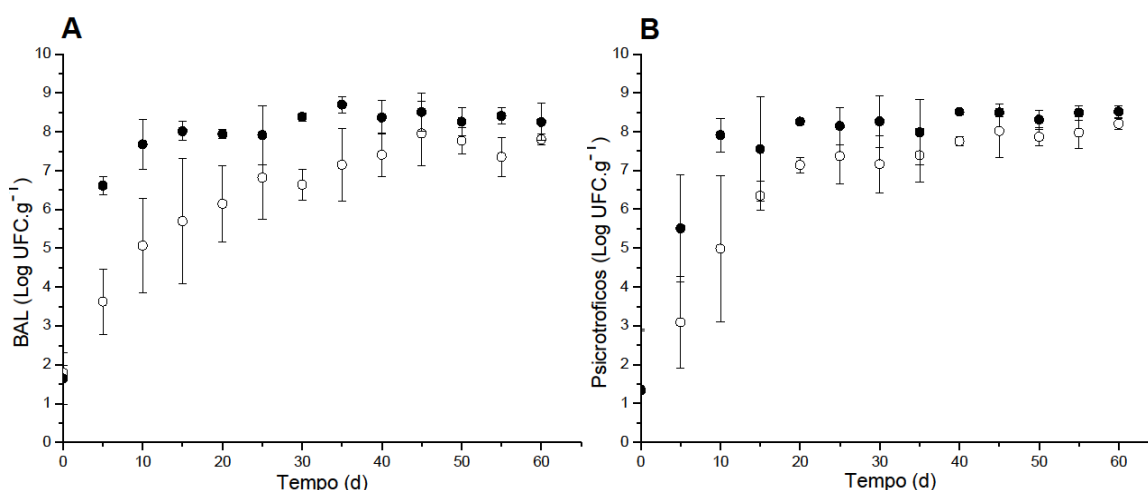
## 2.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos nas determinações físicas, químicas e microbiológicas dos três lotes de salsichas foram analisados e comparados pelo teste t de comparação pareada ( $p \leq 0,05$ ) entre as salsichas armazenadas a 5 ou 15 °C, em cada um dos tempos, usando o SAS (version 9.3, SAS Institute Incorporation, USA; licenciado pela Universidade Federal de Viçosa). Um modelo exponencial foi ajustado aos dados de contagem de BAL e psicrotróficos totais ao longo do tempo. As demais variáveis foram submetidas a análises de variância (ANOVA) que se significativa, procedia-se o teste de Dunnet, que compara cada valor com os valores nos tempos zero para cada tratamento.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Crescimento microbiano

A multiplicação de BAL foi maior nas salsichas armazenadas a 15 °C, sendo observado um aumento de quase 7 ciclos logarítmicos (log) no decorrer dos 60 d de armazenamento (Figura 3A). Nas salsichas armazenadas a 5 °C a população de BAL aumentou em 6 ciclos log ao longo do tempo (Figura 3A). Comportamento similar foi observado na população de psicrotróficos: um aumento de 7,2 ciclos log nas salsichas armazenadas a 15 °C e de 6,8 ciclos log nas armazenadas a 5 °C (Figura 3B).



**Figura 3:** Multiplicação de bactérias do ácido lático e de psicrotróficos em salsichas embaladas a vácuo armazenadas a 5 °C (o) e a 15 °C (●) durante 60 d.

Na Tabela 1 está apresentado o modelo de regressão ajustado aos dados e os parâmetros de ajuste (Eq. 05), onde A e  $\tau$  são os parâmetros de ajuste, t é o tempo (d), e UFC·g<sup>-1</sup> é a contagem de células por grama de salsicha.

**Tabela 1:** Modelo de regressão ajustado os dados de multiplicação bacteriana em salsichas embaladas a vácuo ao longo do tempo.

$\log(\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}) = A \cdot (1 - e^{-t/\tau})$	(Eq 05)		
	Parâmetros de ajuste		Indicador do ajuste
	A	$\tau$	R <sup>2</sup>
Bactérias do ácido láctico a 5 °C	7,52	1,94	0,90
Bactérias psicrotróficas a 5 °C	7,93	1,97	0,96
Bactérias do ácido láctico a 15 °C	8,36	1,04	0,93
Bactérias psicrotróficas a 15 °C	8,37	1,09	0,94

A: densidade populacional máxima alcançada pela população;  $\tau$ : tempo para atingir a densidade populacional máxima; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

Ao se avaliar o modelo de regressão proposto para o crescimento microbiano, observa-se que os valores de R<sup>2</sup> indicam bons ajustes dos dados ao modelo proposto. O parâmetro A representa o valor de contagem em que as populações bacterianas tem sua multiplicação estabilizada, isto é, representa a densidade populacional máxima. A densidade populacional máxima de crescimento é observada na fase estacionária, momento no qual a velocidade de crescimento é similar à velocidade de morte (NYSTRÖM, 2004). O parâmetro  $\tau$  está relacionado ao tempo necessário para que a população atinja a fase estacionária. Menores valores de  $\tau$  são observados para as populações das salsichas armazenadas a 15 °C, indicando que estas populações atingem mais rapidamente a fase estacionária de crescimento.

Ao observar as curvas de crescimento (Figura 3) e o parâmetro  $\tau$  para os tratamentos (Tabela 1) nota-se que a multiplicação bacteriana é mais lenta nas salsichas armazenadas a 5 °C e mais intensa naquelas a 15 °C, tanto para BAL quanto para psicrotróficos. Em 20 d de armazenamento a 5 °C, a população de BAL das salsichas havia aumentado em 4,4 ciclos log, e as salsichas ainda não apresentavam sinais de deterioração. Para aquelas armazenadas a 15 °C, aos 20 d observou-se um aumento de 6,7 ciclos log de BAL, e a partir deste momento as salsichas apresentavam intenso mau odor e limosidade superficial (Figura 4). Além disso, a partir de 40 d as contagens praticamente não se alteram, pois as populações atingem a fase estacionária e densidades populacionais similares a 5 e a 15 °C são observadas. Pode-se afirmar, portanto, que a temperatura de 5 °C, recomendada pelo fabricante, não é capaz de evitar a multiplicação bacteriana no produto, apenas retarda seu desenvolvimento.

Uma carga bacteriana de  $10^8$  UFC·g<sup>-1</sup> é considerada muito alta para um produto cárneo dentro do prazo de validade e indica que a vida útil estipulada pelo fabricante das salsichas não condiz com a carga microbiana que seu produto atinge armazenado sob condição considerada ideal. É bem definido na literatura que a deterioração microbiana de produtos cárneos ocorre quando contagens alcançam  $10^7$  a  $10^8$  UFC·g<sup>-1</sup> que é quando geralmente são observadas alterações macroscópicas como mau odor, descoloração e formação de limo (GRAM et al., 2002; KOUTSOUMANIS et al., 2008; DEGIRMENCIOGLU et al., 2012; STOOPS et al., 2015).

O mau odor e limo observados em produtos cárneos embalados a vácuo é associada à presença de BAL, principalmente BAL heterofermentativas, que excretam para o meio uma variedade de compostos resultantes do seu metabolismo como os ácidos lático e acético e longas cadeias de polímeros de elevada massa molecular (KORKEALA, SUORTTI & MÄKELÄ 1988; CASABURI et al., 2015). A produção desses exopolímeros faz parte do metabolismo bacteriano e ocorre naturalmente nas células, sendo visível a olho nu somente quando produzido em um ritmo muito intenso provocado por condições estressantes por quais as células passam como a superpopulação do ambiente no qual estão inseridas, condições de embalagem e armazenamento sob refrigeração. Esta produção de exopolímeros é associada a mecanismos celulares de adesão e formação de biofilmes, proteção celular a estresses como desidratação e população elevada (AYMERICH et al., 2002; IULIETTO et al., 2015;). Isso explica o fato de apenas as salsichas armazenadas a 15 °C terem apresentado formação de limo superficial, uma vez que o estresse populacional (nível populacional elevado  $\sim 10^8$  UFC·g<sup>-1</sup>) nesta população foi mais duradouro (iniciou muito cedo), levando estas células a produzirem grandes quantidades de limo observável a olho nu.

A produção de limo por BAL é um fenômeno complexo e ainda pouco claro que tem sido alvo de estudos ao longo dos anos. Especula-se que os expolímeros desempenhem papel importante no reconhecimento celular, nos mecanismos de quorum sensing, adesão e formação de biofilmes, na troca de informações genéticas, além da proteção da integridade celular contra desidratação, ataques fágicos, antibióticos (ZANNINI et al., 2016; HE et al., 2015; FLEMMING & WINGENDER, 2010; WALTER et al., 2008; RUAS-MADIEDO, HUGENHOLTZ & ZOON, 2002)



**Figura 4:** Limo superficial observado a partir do vigésimo dia em salsichas armazenadas a 15 °C.

A similaridade observada entre as curvas de crescimento microbiano e entre os parâmetros de ajustes para as mesmas temperaturas de armazenamento indicam que as bactérias psicrotróficas observadas neste estudo sejam as próprias BAL. As condições de uma linha de processamento de produtos cárneos, como baixas temperaturas, favorecem a adaptação de espécies de BAL que passam a colonizar o ambiente e se disseminam nos produtos (POTHAKOS et al., 2015). Hultman et al. (2015) verificaram que a maioria da microbiota colonizadora de uma linha de processamento de salsichas e das próprias salsichas compreende em psicrotróficos tipicamente deterioradores. E diversos estudos relatam BAL psicrotróficas como as principais responsáveis pela deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo e armazenados sob temperaturas abaixo de 10 °C (SARAQUI et al., 2016; CHENOLL et al., 2007; HAMASAKI et al., 2003; BORCH & MOLIN, 1988). O uso de PCA para enumeração de BAL em amostras de alimentos é relatado na literatura, sendo PCA o meio de cultura recomendado pelo Food and Drug Administration (FDA) coreano para contagem total de BAL em produtos comerciais. Isto reforça a ideia de que os psicrotróficos observados neste estudo sejam as próprias BAL, as quais são plenamente capazes de se multiplicar e formar colônias em PCA (LEE & LEE, 2008; YAN et al., 2008; CAI et al., 1999).

Embora não tenha sido realizada uma avaliação das condições higiênicas sanitárias in loco da planta de processamento das salsichas, a literatura relaciona a contaminação por BAL e psicrotróficos em produtos cárneos refrigerados com o próprio ambiente de processamento, com falhas na higienização de equipamentos e nas condições de embalagem e armazenamento (SAMELIS, KAKOURI, & REMENTZIS, 2000). De fato, a etapa de embalagem das salsichas em estudo não é totalmente automatizada. As salsichas são manualmente dispostas na

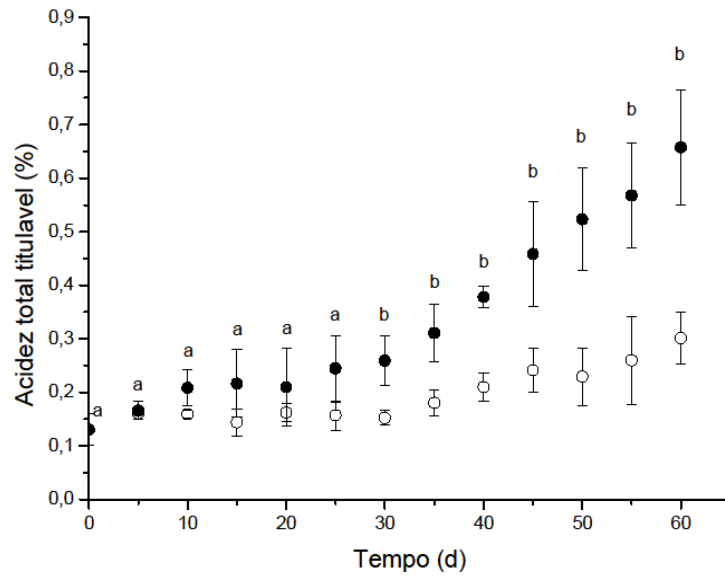
embalagem plástica antes de seguirem para a seladora, o que reflete na elevada carga microbiana observada no produto desde os primeiros dias após a sua fabricação.

Além das condições higiênico-sanitários nas linhas de processamento, Alcântara, Gatto e Kozusny-Andreani (2014) associam a deterioração de produtos cárneos a abusos na temperatura de armazenamento e à qualidade inicial da matéria-prima. Condições higiênico-sanitárias adequadas no abate animal e na obtenção das carnes são pontos críticos para a qualidade dos produtos cárneos, pois quanto maior for a carga microbiana inicial, mais rápida será a deterioração da carne (STELLATO et al., 2016). Apesar de as salsichas armazenadas sob condições ideais de temperatura terem apresentado altas contagens bacterianas, o efeito sobre a carga microbiana daquelas armazenadas em temperatura de abuso foi mais expressivo.

Não foram observados *Clostridium* sulfito redutores ( $< 10 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ), bem como fungos filamentosos e leveduras ( $< 100 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ). A não detecção de *Clostridium* spp. viáveis cultiváveis na menor diluição utilizada reflete da eficiência do nitrito como antimicrobiano, cuja aplicação em produtos cárneos objetiva inibir a germinação de esporos de *C. botulinum*, micro-organismo referência na indústria de embutidos cárneos (FARIA, 2001). No que se refere à ausência de fungos filamentosos, pode-se dizer que embalagens a vácuo promovem bons resultados para o controle destes nos alimentos, uma vez que não é típico o seu crescimento nas superfícies de produtos mantidos em condições anaeróbicas (PETRUZZI et al., 2017). Leveduras podem se desenvolver tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, e colonizam tipicamente produtos com alto teor de açúcar ou sal. Apesar de não terem sido observadas nas salsichas em estudo, leveduras como *Debaryomyces hansenii* e *Candida alimentaria* têm sido reportadas em produtos cárneos curados (NIELSEN et al., 2008; RAWAT, 2015; RAMOS et al., 2017).

### **3.2. Acidez total titulável e Atividade de água**

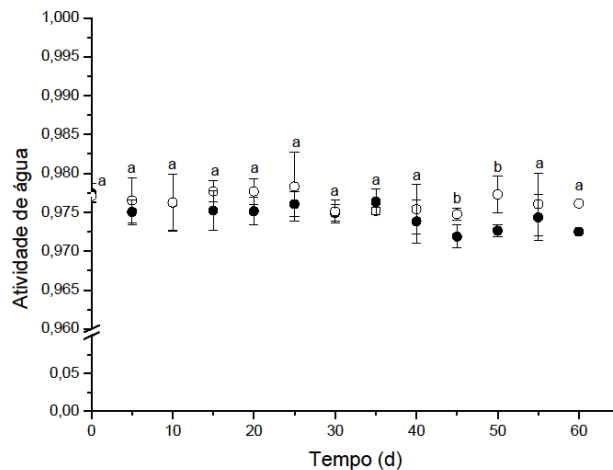
Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre a ATT das as salsichas armazenadas a 5 e 15 °C foram observadas a partir do 30º dia. Ao longo do tempo, a ATT das salsichas aumentou a partir de 35 d para as salsichas armazenadas a 15 °C, e para as salsichas a 5 °C, somente a partir de 45 d o aumento foi significativo ( $p \leq 0,05$ ). O aumento gradual da ATT (Figura 5) observado nas das salsichas é resultado do metabolismo bacteriano. As bactérias presentes utilizam os carboidratos e nutrientes da matriz do alimento para se multiplicarem e, como resultado de sua multiplicação, produzem metabólitos como os ácidos láctico, acético e succínico (GANZLE, 2015).



**Figura 5:** Comportamento da acidez total titulável das salsichas armazenadas a 5 °C (o) e 15 °C (●) em função do tempo.

a: médias a 5 °C e 15 °C não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); b: médias a 5 °C e 15 °C diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Não houve diferença significativa na atividade de água das salsichas armazenadas a 5 °C e 15 °C, pelo teste t ( $p > 0,05$ ). A atividade de água das salsichas, considerada um dos principais parâmetros na conservação de alimentos, não variou ao longo do tempo (Figura 6) e se manteve em níveis favoráveis ao desenvolvimento bacteriano (0,98), o que indica uma baixa permeabilidade ao vapor d'água das embalagens das salsichas e, certamente, contribuiu para a intensa multiplicação bacteriana no produto.

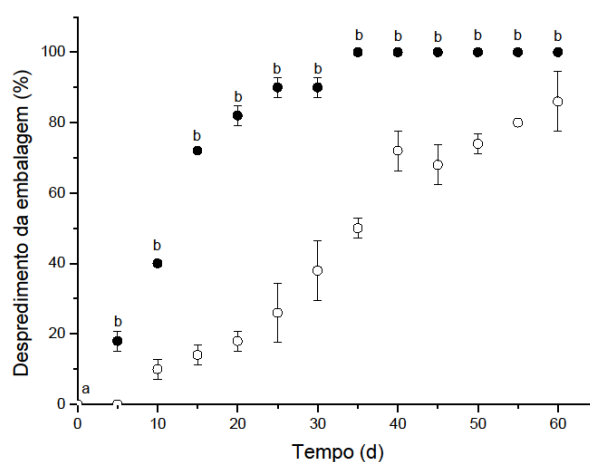


**Figura 6:** Atividade de água das salsichas armazenadas a 5 °C (o) e 15 °C (●) em função do tempo.

a: médias a 5 °C e 15 °C não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); b: médias a 5 °C e 15 °C diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3. Desprendimento da embalagem

Somente no tempo 0 não se observou diferença significativa, pelo teste t ( $p > 0,05$ ), entre as salsichas armazenadas a 5 °C e 15 °C (Figura 7). O desprendimento da embalagem aumentou ao longo do tempo (60 d). Para as amostras armazenadas a 15 °C, a partir do quinto dia já se observava perda de vácuo, e para as salsichas a 5 °C, a partir do décimo dia de armazenamento.



**Figura 7:** Desprendimento da embalagem de salsichas armazenadas a 5 °C (o) e 15 °C (●) em função do tempo.

a: médias a 5 °C e 15 °C não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ); b: médias a 5 °C e 15 °C diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

As embalagens avaliadas neste estudo são de Nylon Poli com taxa de permeabilidade ao Oxigênio de . O filme é composto por cinco camadas de polímeros que conferem características como transparência, o que melhora a imagem do produto embalado; resistência mecânica e barreira a gases e umidade (SOLUPACK®, 2018). Quanto à integridade física, todas as das embalagens em estudo apresentaram-se intactas, sem nenhuma ruptura visível.

A estrutura de filme plástico mais utilizada para embalagem a vácuo de produtos cárneos curados e cozidos combina de três a cinco camadas de poliamida/ nylon, polietileno e poliolefinas especiais (OLIVEIRA et al., 2006). Nestes filmes multicamadas, cada camada possui uma função específicas como barreira ao oxigênio, barreira ao vapor de água, selabilidade, resistência mecânica. Por isso, é feita a combinação de diferentes materiais para compor uma embalagem (PETTERSEN et al., 2004).

Em geral, os nylons (poliamidas) são muito permeáveis ao vapor d'água e absorvem umidade, acarretando prejuízos nas propriedades de barreira a gases e a vapores orgânicos. Mas por outro lado, a sua rigidez, estabilidade térmica e mecânica e baixa permeabilidade ao

oxigênio promovem boas características à embalagem (JORGE, 2013). Já os filmes de polietileno possuem baixa permeabilidade a vapores de água e elevada permeabilidade ao oxigênio, boa resistência à tração e à perfuração. Estes materiais, quando combinados, promovem características satisfatórias de resistência e baixa permeabilidade a vapor d'água e a gases, o que é primordial para o acondicionamento de produtos cárneos como as salsichas (JORGE, 2013).

Neste estudo observou-se que diferentes temperaturas de estocagem (5 °C e 15 °C) exerceram influência na permeabilidade das embalagens a gases, notado pelo aumento do desprendimento da embalagem ao longo do tempo (Figura 7), mas não interferiram ( $p > 0,05$ ) na barreira à umidade, conforme apontado pela análise da atividade de água (Figura 6). O desprendimento das embalagens foi mais drástico nas salsichas armazenadas a 15 °C, havendo perda total do vácuo em 35 d de armazenamento. A diminuição na cristalinidade provocada pelo aumento da temperatura de armazenamento das embalagens ocorre devido ao aumento do espaçamento entre as ligações intermoleculares na cadeia polimérica do material. Isso prejudica a barreira a gases e a vapor d'água pelo filme, aumenta a permeabilidade a estes, o que justifica o maior desprendimento da embalagem a 15 °C (MACHADO et al., 2010; VOGELSANGER et al., 2003; TAVARES et al., 2000).

A permeabilidade a gases e a vapor de água das embalagens é uma característica relevante para o crescimento microbiológico e deterioração do produto. Quando trocas gasosas entre o microambiente da embalagem e o exterior acontecem, o vácuo da embalagem é comprometido, o que modifica o microambiente podendo favorecer alterações do produto (PHILLIPS, 1996). Além da entrada de ar na embalagem por alteração da sua permeabilidade, o metabolismo heterofermentativo das BAL resulta na produção de diversos metabólitos além do ácido lático, como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) que também contribui para a perda do vácuo das embalagens (ZHANG et al., 2009).

#### **3.4. Análise Instrumental da cor**

Não foram observadas diferenças significativas, pelo teste t ( $p > 0,05$ ), nos parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^*$  das salsichas armazenadas a 5 °C e 15 °C. A cor das salsichas também não se alterou ao longo do armazenamento, independente da temperatura.

A cor é um importante atributo de qualidade que influencia na escolha de produtos cárneos pelo consumidor, e a sua estabilidade durante a vida útil do produto é importante para que não haja rejeição (GLITSCH, 2000).

Embora a temperatura de armazenamento tenha se mostrado um fator determinante para a qualidade microbiológica e físico-química das salsichas, ela não influencia ( $p > 0,05$ ) na cor desses produtos. O armazenamento das salsichas em uma temperatura abusiva não promoveu alterações que depreciassem a aparência do produto, com excessão da limosidade superficial observada.

Apesar de o primeiro contato entre o consumidor e o produto ser a partir do exterior do produto, a sua aparência como um todo (superfície e interior) influencia na aceitação (KOBAYASHI & BENASSI, 2015). A cor rósea-avermelhada observada na parte interna das salsichas, típica de produtos cárneos curados, é obtida por meio do uso do nitrito ( $\text{NO}_2$ ), ou mesmo do nitrito combinado com outros sais. Apesar de ser largamente utilizado em embutidos cárneos com a finalidade de preservar, por suprimir a germinação de esporos de *C. botulinum* e controlar o crescimento de outros patógenos, como *Listeria monocytogenes*, alguns autores afirmam que tão importante quanto o efeito antibacteriano do íon nitrito é a formação e fixação da cor rósea-avermelhada característica de produtos curados (FARIA, 2001; TOLDRÁ, 2017).

#### 4. CONCLUSÃO

A temperatura de armazenamento se mostrou um fator relevante na deterioração de salsichas. Apesar de apenas as salsichas a 15 °C terem apresentado mau odor e formação de limo, a elevada carga microbiana alcançada e a duplicação da acidez ao longo do armazenamento nas salsichas a 5 °C chama a atenção e deixa claro que o produto, mesmo sob temperatura ideal, estava se deteriorando, apesar de não ter apresentado alterações macroscópicas. A multiplicação mais lenta de BAL a 5 °C contribuiu para retardar o estresse populacional bacteriano que estimula a formação de limo no produto. A cor das salsichas não se alterou, independente da temperatura de armazenamento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAHAKOON, A. U.; JAYASENA, D. D.; RAMACHANDRA, S.; JO, C. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 37-49, 2015.

ALCÂNTARA, M. A.; GATTO, I. R. H.; KOZUSNY-ANDREANI, D. Avaliação do perfil microbiológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens a vácuo e a granel. **Veterinária em Foco**, v. 10, n. 1, p. 68-79, 2014.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4<sup>a</sup> ed. Washington: APHA, 2001. 676p.

- AYMERICH, M.T.; GARRIGA, M.; COSTA, S.; MONFORT, J. M.; HUGAS, M. Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 239-246, 2002.
- BORCH, E.; MOLIN, G. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 54, n. 4, p. 301-323, 1988.
- CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; KUMAI, S. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 520-526, 1999.
- CASABURI, A.; PIOMBINO, P.; NYCHAS, G. J.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. **Food Microbiology**, v. 45, p. 83-102, 2015.
- CHENOLL, E.; MACIÁN, M. C.; ELIZAQUIVEL, P.; AZNAR, R. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 498-508, 2007.
- DEGIRMENCIOGLU, N.; ESMER, O. K.; IRKIN, R.; DEGIRMENCIOGLU, A. Effects of vacuum and modified atmosphere packaging on shelf life extension of minced meat chemical and microbiological changes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 898-911, 2012.
- DOHLEN, S.; BRAUN, C.; BRODKORB, F.; FISCHER, B.; ILG, Y.; KALBFLEISCH, K.; LORENZ, R.; KREYENSCHMIDT, M.; KREYENSCHMIDT, J. Effect of different packaging materials containing poly-[2-(tert-butylamino) methylstyrene] on the growth of spoilage and pathogenic bacteria on fresh meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 91-100, 2017.
- FARIA, J. A. F.; FELÍCIO, P. E.; NEVES, M. A.; ROMANO, M. A. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados. **Revista Tecnologia de Carnes**, v. 3, n. 2, p. 16-22, 2001.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623–633, 2010.
- GANZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v.2, p. 106-117, 2015.
- GLITSCH, K. Consumer perceptions of fresh meat quality: crossnational comparison. **British Food Journal**, v. 102, p. 177-194, 2000.
- HAMASAKI, Y.; AYAKI, M.; FUCHU, H.; SUGIYAMA, M.; MORITA, H. Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3668-3671, 2003.
- HE, Z.; LIANG, J.; TANG, Z.; MA, R.; PENG, H.; HUANG, Z. Role of luxS gene in initial biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 60–68, 2015.

- HERNÁNDEZ, B.; SÁENZ, C.; ALBERDI, C.; DIÑEIRO, J. M. CIELAB color coordinates versus relative proportions of myoglobin redox forms in the description of fresh meat appearance. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 12, p. 4159-4167, 2016.
- HULTMAN, J.; RAHKILA, R.; ALI, J.; ROUSU, J.; BJÖRKROTH, K. J. Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7088-7097, 2015.
- IAL - Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 103. 1985.
- IULIETTO, M. F.; SECHI, P.; BORGOGNI, E.; CENCI-GOGA, B. T. Meat spoilage: a critical review of a neglected alteration due to ropy slime producing bacteria. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 3, p. 316-326, 2015.
- JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat 550 products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, n. 2, p. 96-108, 2013.
- JORGE, N. Embalagens para alimentos. **Cultura Acadêmica**: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, São Paulo, 2013.
- JUNG, S.; KIM, H. J.; PARK, S.; YONG, H. I.; CHOE, J. H.; JEON, H. J.; CHOE, W.; JO, C. The use of atmospheric pressure plasma-treated water as a source of nitrite for emulsion-type sausage. **Meat science**, v. 108, p. 132-137, 2015.
- KOBAYASHI, M. L.; BENASSI, M. D. T. Impact of packaging characteristics on consumer purchase intention: Instant coffee in refill packs and glass jars. **Journal of Sensory Studies**, v. 30, n. 3, p. 169-180, 2015.
- KORKEALA, H. J.; BJÖRKROTH, K. J. Microbiological Spoilage and Contamination of Vacuum-Packaged Cooked Sausages. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 724-731, 1997.
- KORKEALA, H.; SUORTTI, T.; MÄKELÄ, P. Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 339-347, 1988.
- KOUTSOUMANIS, K. P.; GOUGOULI, M. Use of time temperature integrators in food safety management. **Trends in Food Science & Technology**, v. 43, n. 2, p. 236-244, 2015.
- KOUTSOUMANIS, K. P.; STAMATIOU, A. P.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. E. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. **Food Microbiology**, v. 25, p. 915-921, 2008.
- LEBOSSÉ, R.; DUCRUET, V.; FEIGENBAUM, A. Interactions between reactive aroma compounds from model citrus juice with polypropylene packaging film. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2836-2842, 1997.
- LEE, H. M.; LEE, Y. A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 6, p. 676-681, 2008.

- MACHADO, M. L., PEREIRA, N. C., MIRANDA, L. F. D., TERENCE, M. C., & PRADELLA, J. G. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxitirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, 2012.
- NIELSEN, D. S.; JACOBSEN, T.; JESPERSEN, L.; KOCH, A. G.; ARNEBORG, N. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products—Implications for potential spoilage. **Meat science**, v. 80, n. 3, p. 919-926, 2008.
- NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat science**, v. 78, p. 77-89, 2008.
- NYSTRÖM, T. Stationary-phase physiology. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p.161-181, 2004.
- OLIVEIRA, L. M.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; CUNHA, D. G.; LEMOS, A. B. Embalagens termoformadas e termoprocessáveis para produtos cárneos processados. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 3, p. 202-210, 2006.
- PETRUZZI, L.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals. In: **The Microbiological Quality of Food**. Elsevier, 2017, p. 1-21.
- PETTERSEN, M. K.; NILSSON, A.; ESPEDAL, A.; KOHLER, A. Prediction of Oxygen Transmission Rate for Thermoformed Trays. **Packaging Technology and Science**, v. 17, p. 321-332, 2004.
- PHILLIPS, C. A. Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 31, n. 6, p. 463-479, 1996.
- POTHAKOS, V.; DEVLIEGHERE, F.; VILLANI, F.; BJÖRKROTH, J.; ERCOLINI, D. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat science**, 109, 66-74, 2015.
- POTHAKOS, V.; NYAMBI, C.; ZHANG, B. Y.; PAPASTERGIADIS, A.; DE MEULENAER, B.; DEVLIEGHERE, F. Spoilage potential of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) species: *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* and *Lactococcus piscium*, on sweet bell pepper (SBP) simulation medium under different gas compositions. **International journal of food microbiology**, v. 178, p. 120-129, 2014.
- RAMOS, J.; MELERO, Y.; RAMOS-MORENO, L.; MICHAN, C.; CABEZAS, L. *Debaryomyces hansenii* Strains from Valle De Los Pedroches Iberian Dry Meat Products: Isolation, Identification, Characterization, and Selection for Starter Cultures. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 1576-1585, 2017.
- RAWAT, S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 5, n. 4, p. 47-56, 2015.
- RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, v. 2-3, p. 163-171, 2002.

- RUKCHON, C.; NOPWINYUWONG, A.; TREVANICH, S.; JINKARN, T.; SUPPAKUL, P. Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. **Talanta**, v. 130, p. 547-554, 2014.
- SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329-340, 2000.
- SARAOUI, T.; LEROI, F.; BJÖRKROTH, J.; PILET, M. F. Lactococcus piscium: a psychrotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food - a review. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 4, p. 907-918, 2016.
- SAUCIER, L. Microbial spoilage, quality and safety within the context of meat sustainability. **Meat science**, v. 120, p. 78-84, 2016.
- SOLUPACK- Sistemas de embalagens. Disponível em: <<http://www.solupack.com.br/NylonPoli.aspx>>. Acesso em 29 de setembro de 2018.
- STELLATO, G.; LA STORIA, A.; DE FILIPPIS, F.; BORRIELLO, G.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 13, p. 4045-4054, 2016.
- STOOPS, J.; RUYTERS, S.; BUSSCHAERT, P.; SPAEPEN, R.; VERRETH, C.; CLAES, J., LIEVENS, B.; VAN CAMPENHOUT, L. Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. **Food microbiology**, v. 48, p. 192-199, 2015.
- TAVARES, A. C.; LEPIENSKI, C. M.; UNGARI, M. B.; MATTOSO, N.; CANTÃO, M. P. Análise da influência do grau de cristalinidade nas propriedades nanomecânicas e viscoelásticas do PET. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, São Pedro, SP, 2000.
- TOLDRÁ, F. The Storage and Preservation of Meat: III—Meat Processing. In: **Lawrie's Meat Science**. 8 Ed. Elsevier, 2017, p. 265-296.
- VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. D. S.; FURLAN, S. A.; BERNARDO, H. P.; PEZZIN, S. H.; PIRES, A. T. N.; DUEK, E. A. D. R. Blendas biodegradáveis de poli (3-hidroxibutirato)/poli (ε-caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 359-365, 2003.
- WALTER, J.; SCHWAB, C.; LOACH, D. M.; GÄNZLE, M. G.; TANNOCK, G. W. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of Lactobacillus reuteri TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. **Microbiology**, v. 154, p. 72-80, 2008.
- YAN, P. M.; XUE, W. T.; TAN, S. S.; ZHANG, H.; CHANG, X. H. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai. **Food control**, v. 19, n. 1, p. 50-55, 2008.

ZANNINI, E.; WATERS, D. M.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1121-1135, 2016.

ZHANG, H.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; SUN, X. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. **Meat Science**, v. 81, p. 686–692, 2009.

## CAPÍTULO 3

### CARACTERIZAÇÃO METAGENÔMICA DE BACTÉRIAS EM SALSICHAS EMBALADAS A VÁCUO E ARMAZENADAS SOB REFRIGERAÇÃO IDEAL E ABUSIVA

#### RESUMO

A carne, bem como seus derivados, é um complexo microambiente com características que favorecem a multiplicação de uma ampla variedade de micro-organismos. O estudo da microbiota de um determinado produto cárneo permite conhecer a diversidade bacteriana e associar a ela as alterações que acontecem no produto ao longo do armazenamento. Na literatura muito pouco é encontrado sobre a microbiota de salsichas cozidas embaladas a vácuo, que são produtos amplamente consumidos em todo o mundo. O objetivo deste trabalho foi estudar a composição da comunidade bacteriana de salsichas cozidas embaladas a vácuo e avaliar se diferentes lotes e temperaturas de armazenamento alteram as microbiotas deste produto. As salsichas, provenientes de dois lotes de uma mesma marca, foram coletadas diretamente da linha de processamento e armazenadas a 5 ou 15 °C. A cada 5 d, ao longo de 60 d, as amostras foram submetidas a extrações de DNA total e a determinações de pH. Nas salsichas armazenadas a 5 °C o pH foi de 6,4 para 5,9, enquanto que nas salsichas armazenadas a 15 °C foi de 6,4 para 5,2. Previamente à extração de DNA, as amostras passaram por uma centrifugação (5000 rpm por 5 min) afim de retirar excesso de gordura. Os DNA's foram amplificados (regiões V3 e V4 do 16S rRNA) e os amplicons foram sequenciados (Illumina MiSeq) e classificados com base em quatro bancos de dados do gene 16S rRNA de bactérias (RDP database, Silva database, HIT database e NCBI). Além da predominância de bactérias do ácido lático (BAL), grandes quantidades de DNA de soja e uma significativa porção de sequências genômicas bacterianas ainda desconhecidas foram encontradas. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os microbiomas bacterianos das salsichas armazenadas sob diferentes temperaturas e provenientes de diferentes lotes. *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* e *Lactococcus lactis* foram predominantes em ambas as condições de armazenamento.

Palavras chave: bactérias do ácido lático, 16S rRNA, sequenciamento, microbioma.

## 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos estão amplamente distribuídos na natureza, compondo os mais diversos ecossistemas existentes. Mas grande parte desses, ainda são desconhecidos ou não cultiváveis sob as condições existentes (MORA et al., 2011). Apesar de ser um método padrão utilizado durante muitos anos, o cultivo de micro-organismos em placa é limitado e possibilita detectar cerca de 0,1 % de uma comunidade. Para superar essas limitações, métodos independentes de cultivo, como a metagenômica e o sequenciamento do gene ribossomal 16S, foram desenvolvidos e têm sido amplamente utilizadas na microbiologia de alimentos (KATZ, HOVER & BRADY, 2016).

Metagenômica é o estudo dos genomas dos organismos presentes em um determinado nicho, a partir do sequenciamento de todo o conteúdo de DNA ou de RNA obtido de um microambiente (HANDELSMAN, 2004). Além da classificação taxonômica do microbioma, o estudo metagenômico permite comparar a diversidade dos organismos em amostras complexas como é o caso dos alimentos (CAO et al., 2017). Um dos desafios da metagenômica é o volume de dados gerados cuja análise requer conhecimentos avançados em bioinformática, e procedimentos inadequados na análises desses dados podem levar a conclusões incorretas sobre uma comunidade microbiana. Embora existam bons bancos de dados usados como referência para a classificação taxonômica em um estudo de metagenômica, as referências são, ainda, limitadas (WOOLEY & YE, 2010).

Os micro-organismos que compõem o microbioma de uma matriz alimentar são responsáveis por desencadear eventos importantes como a contaminação, deterioração e fermentação. Avanços nas tecnologias de sequenciamento ao longo dos anos propiciaram a identificação, a nível de espécie, e o monitoramento de comunidades microbianas em matrizes alimentares, permitindo alavancar estudos de sucessão microbiana em alimentos fermentados, por exemplo, ou ainda, detectar contaminantes e deterioradores em amostras de alimentos (CAO et al., 2017).

As matérias-primas de origem animal e vegetal utilizadas para a produção de um alimento trazem consigo determinados micro-organismos que irão compor a microbiota do produto. Esses micro-organismos derivam de uma infinidade de ecossistemas, conhecidos e não conhecidos, a partir dos quais eles se disseminam (MAGAN & ALDRED, 2007). Condições higiênicas sanitárias adequadas no abate animal e na obtenção das carnes, por exemplo, são fatores determinantes para a qualidade dos produtos cárneos, uma vez que a carga microbiana

aí existente será levada para o produto final (STELLATO et al., 2016). Mas além da matéria-prima, o ambiente de processamento também exerce influência sobre a microbiota de um produto, conforme relatado por Hultman e colaboradores (2015), que observaram por meio de sequenciamento do gene 16S rDNA a existência de similaridades entre as microbiotas do ambiente de processamento e das salsichas nele produzidas. Com o intuito de estender o prazo de vida útil de produtos perecíveis, como os produtos cárneos, a indústria lança mão do efeito combinado de diferentes recursos como o uso de conservantes, o armazenamento sob refrigeração, a embalagem a vácuo. Estudos recentes mostram que o perfil microbiano se altera consideravelmente quando os produtos são armazenados sob diferentes condições. E é razoável pensar que essas alterações no microbioma interfiram na qualidade do produto, ao acelerar processos de deterioração por exemplo (STELLATO et al., 2017).

Desde a introdução do estudo de populações microbianas por sequenciamento de genes por Carl Woese, vários outros estudos têm destacado o uso de técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) em estudos do microbioma de alimentos fermentados, como queijos e salames. Porém, quando se trata de alimentos não fermentados como as salsichas cozidas, poucos estudos são observados (PATRA et al., 2016; DE FILIPPIS et al., 2017). Considerando este fato, o presente estudo objetivou caracterizar a microbiota de salsichas cozidas embaladas a vácuo armazenadas sob refrigeração recomendada pelo fabricante e sob uma temperatura de abuso, e verificar se e como as condições de armazenamento influenciam no perfil microbiano das salsichas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta das amostras**

Salsichas amostradas de dois lotes foram analisadas neste trabalho. De cada lote coletou-se 24 pacotes de 450 g, que foram armazenadas durante 60 d sob duas temperaturas, uma considerada como recomendada para o produto (5 °C) e outra considerada como abusiva (15 °C), e a cada cinco dias, desde o dia do processamento (tempo 0) até 60 d após a fabricação (tempo 12), as salsichas foram submetidas a determinações de pH e extração de DNA total.

### **2.2. Determinação do pH**

O pH foi determinado em alíquotas de 50 mL de um homogenato (25 g de salsichas + 225 mL de solução salina (0,85 % m/ m) peptonada (0,1 % m/ m) usando um potenciômetro de bancada (mPA-210, MS Tecnocon, Brasil).

### 2.3. Extração de DNA total

Para extração do DNA total utilizou-se o kit de extração (Wizard® Genomic DNA Purification, Promega Corporation, 2017) com modificações no protocolo do fabricante, pelo fato de se tratar de uma amostra complexa no que diz respeito à composição, ao contrário de quando se extrai DNA de culturas puras.

Em béqueres de vidro esterilizados foram pesados, em triplicata, 30 g de salsichas previamente trituradas os quais foram ressuspensos em 30 mL de tampão TE (EDTA 1 mM, TrisHCl 10 mM, pH 8,0). Esta mistura foi passada através de uma peneira de aço inoxidável ( $\emptyset$  0,1 cm) esterilizada e o filtrado recuperado foi distribuído em microtubos de 2,0 mL. Centrifugou-se (Mikro 200R Hettich Zentrifugen) a 5000 rpm por 5 min para separar a gordura das amostras. Com o auxílio de um pipetador o sobrenadante gorduroso foi cuidadosamente aspirado e o sedimentado foi ressuspensionado em 500  $\mu$ L de EDTA 50 mM. Este conteúdo foi transferido para outro microtubo contendo sedimentado da mesma amostra e ressuspendeu-se novamente, até que se concentrasse três sedimentados de uma mesma amostra em um só microtubo. Isso foi feito com a intenção de concentrar um maior número de células bacterianas da amostra em análise e potencializar a extração de DNA. Em seguida, procedeu-se uma centrifugação a 15000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi descartado. A partir deste ponto, seguiu-se o protocolo de extração do fabricante, consistindo nas seguintes etapas:

- a. O sedimentado foi gentilmente ressuspensionado em 150  $\mu$ L de lisozima.
- b. Incubou-se a 37 °C por 60 min, e após isso, centrifugou-se a 15000 rpm por 2 min e descartou-se o sobrenadante.
- c. Adicionou-se 600  $\mu$ L de solução de lise e pipetou-se gentilmente para ressuspender as células.
- d. Incubou-se a 80 °C por 5 min, e após resfriar à temperatura ambiente, adicionou-se 3  $\mu$ L de solução RNase e inverteu-se os tubos (2 - 5 vezes) para misturar.
- e. Os tubos foram incubados a 37 °C por 60 min e após resfriar à temperatura ambiente, adicionou-se 200  $\mu$ L da solução de precipitação de proteína. Procedeu-se agitação vigorosa em vortex por 20 s.
- f. Incubou-se as amostras por 5 min em gelo e centrifugou-se a 15000 rpm por 5 min.
- g. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 600  $\mu$ L de isopropanol à temperatura ambiente. Misturou-se gentilmente por inversão até que se

observasse os fios de DNA como uma massa visível e centrifugou-se novamente a 15000 rpm por 2 min.

- h. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e drenou-se o tubo em papel absorvente limpo. Adicionou-se 600 µL de etanol 70 % e inverteu-se gentilmente o tubo várias vezes para lavar o sedimentado de DNA.
- i. Centrifugou-se a 15000 rpm por 2 min e cuidadosamente o etanol foi succionado.
- j. Drenou-se o tubo em papel absorvente limpo e o sedimentado secou à temperatura ambiente por 15 min.
- k. Por fim, 50 µL de solução de reidratação de DNA foram adicionados ao microtubo e incubou-se a 65 °C por 60 min. O DNA foi armazenado a -80 °C.

#### **2.4. Sequenciamento**

As bibliotecas metagenômicas foram produzidas e sequenciadas pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea), usando o sequenciador Illumina MiSeq (Illumina, Estados Unidos). Os amplicons foram obtidos por PCR usando primers específicos (Bakt\_341F e Bakt\_805R) para as regiões V3 e V4 desse gene.

#### **2.5. Análise dos dados de sequenciamento**

Os dados brutos do sequenciamento (arquivos no formato FASTQ) foram processados usando o pacote DADA2 versão 1.8 (<https://github.com/benjjneb/dada2>) no R versão 3.5.0 (<https://cran.r-project.org/>). O processamento dos dados seguiu todos os passos recomendados pelo protocolo publicado pelos desenvolvedores do DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) e envolveu as seguintes etapas: 1) Carregamento dos dados no software; 2) Trimagem dos dados para a remoção das bases mal sequenciadas; 3) Filtragem para eliminar sequências que ficaram menores que 160 nucleotídeos; 4) Remoção das redundâncias e identificação das sequências únicas; 5) Estimação dos erros nos amplicons sequenciados e correção das sequências; 6) Análise da frequência das sequências não redundantes e sua classificação taxonômica, baseando-se em alinhamentos com os bancos de dados RDP database (<http://rdp.life.uiuc.edu>), Silva database (<https://www.arb-silva.de/>) e o HITdb (Human InTestinal 16S rRNA) database (RITARI et al., 2015). Adicionalmente, as sequências também foram comparadas com os banco de dados NCBI 16S RefSeq ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/16S\\_process/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/16S_process/)) e NCBI organelle genome resources (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/organelle/>) usando a ferramenta

BLASTn do software versão 2.7.1 (ALTSCHUL et al.,1990). A partir dessas análises, foi possível identificar os táxons e comparar a distribuição dos grupos taxonômicos de bactérias nas amostras sequenciadas.

## **2.6. Análises estatísticas**

As médias dos grupos experimentais (lotes e temperaturas) foram comparadas para cada táxon (unidade de sequência identificada). Foi feito um teste t ( $p > 0,05$ ) para verificar diferenças entre as amostras, e aplicou-se o teste de Bonferroni que identifica falsos positivos (WHITE, NAGARAJAN & POP, 2009).

Para avaliar o efeito dos lotes e das temperaturas de armazenamento sobre as microbiotas das salsichas procedeu-se uma análise de componentes principais (Principal Component Analysis, PCA) no R versão 3.5.0 (<https://cran.r-project.org/>). O objetivo do PCA é identificar os principais componentes que explicam a variação que existe no conjunto de dados.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A qualidade das 44 amostras enviadas para sequenciamento foi satisfatória e adequada para o preparo das bibliotecas genômicas. A concentração média de DNA por amostra foi de  $82 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

### **3.1. Análise metagenômica das amostras**

Dos 649 táxons sequenciados nas amostras, 433 (68,19 %) não foram classificados taxonomicamente desde o nível hierárquico mais alto, o de Reino. Os outros 216 foram identificados como pertencentes aos reinos Plantae (15,7 %) e Bacteria (16,1 %). As sequências pertencentes ao reino Plantae foram, inicialmente, classificadas como cianobactérias pelo DADA2, mas a análise das sequências no software BLASTn revelou que são táxons referentes a cloroplastos de soja. A diversidade microbiana na natureza é grande, e ainda, muito pouco explorada. Diversos autores sugerem que apenas uma pequena fração dos micro-organismos existentes, cerca de 0,2 % do total, é cultivável, havendo uma vasta porção da microbiota existente na natureza ainda desconhecida e não estudada (STREIT & SCHMITZ, 2004; MORA et al., 2011).

Na Tabela 1 está descrita relação das ordens, famílias, gêneros e espécies dos reinos Bacteria e Plantae identificadas nas amostras. A coluna “Nº de amostras” indica em quantas amostras o táxon relativo ao micro-organismo descrito foi identificado, e a coluna “Frequência”

indica o número de ocorrências dos táxons relativos a cada micro-organismo nas amostras relatadas na coluna anterior.

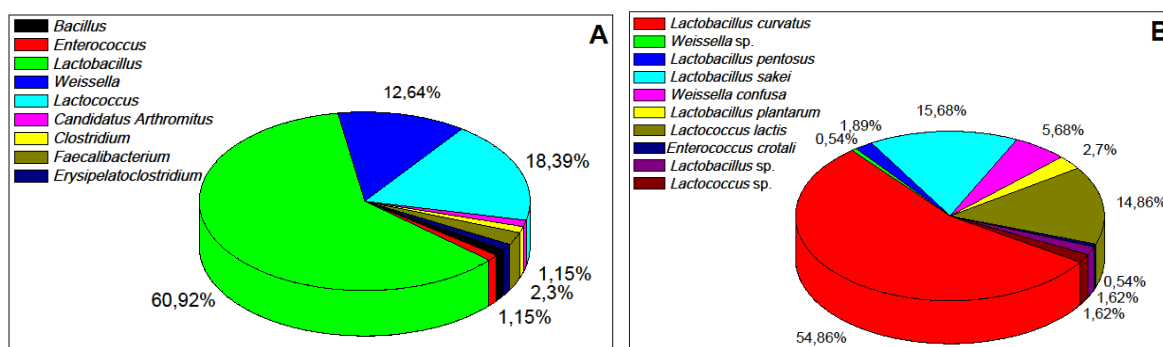
**Tabela 1:** Organismos e sua ocorrência nas amostras de DNA total sequenciadas.

Ordem	Família	Gênero	Espécie	Nº de amostras	Frequência
Gaiellales	Gaiellaceae	Gaiella	indefinido	2	24
Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	dorei	1	2
Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	indefinido	1	2
Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Butyricimonas	synergistica	1	2
Chitinophagales	Chitinophagaceae	Niastella	indefinido	1	44
Cytophagales	Microscillaceae	Chryseolinea	indefinido	1	22
Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	indefinido	1	17
Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	crotali	1	2
Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	curvatus	30	203
Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	pentosus	4	7
Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	plantarum	7	10
Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	sakei	19	58
Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	indefinido	4	6
Lactobacillales	Leuconostocaceae	Weissella	indefinido	1	2
Lactobacillales	Leuconostocaceae	Weissella	confusa	8	21
Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	lactis	17	55
Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	indefinido	4	6
Clostridiales	Clostridiaceae	Candidatus Arthromitus	indefinido	1	46
Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	indefinido	1	68
Clostridiales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium	indefinido	1	3
Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Erysipelatoclostridium	indefinido	1	12
Burkholderiales	indefinido	indefinido	indefinido	1	5
Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Tepidiphilus	indefinido	2	20
Myxococcales	Haliangiaceae	Haliangium	indefinido	1	7
Vibrionales	Vibrionaceae	Grimontia	hollisae	1	43
Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma	indefinido	1	2
Chthoniobacteriales	Chthoniobacteraceae	Chthoniobacter	flavus	1	11
Fabales	Fabaceae	Glycine	soja	44	4302

A literatura relata que bactérias psicrotólicas deterioradoras de produtos cárneos são pertencentes aos três filos mais abundantes nas amostras em estudo, Firmicutes (85,3 %), Proteobacteria (5,88 %) e Bacteroidetes (4,9 %) (HULTMAN et al., 2015). Ainda que tenham

sendo identificados outros filos (0,98 % Tenericutes, 0,98 % Verrucomicrobia e 1,96 % Actinobacteria), a comunidade bacteriana das salsichas é composta majoritariamente por organismos do filo Firmicutes, com quase 86 % dos organismos identificados. Dentro do filo Firmicutes, nove gêneros bacterianos (Figura 1A) foram identificados, dos quais quatro (Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Weissella) pertencem ao diverso grupo das BAL, que compreende os organismos da ordem Lactobacillales (AXELSSON & AHRNÉ, 2000).

As BAL são bactérias de grande interesse em produtos cárneos embalados a vácuo por estarem associadas à deterioração destes produtos. (GANZLE, 2015). As espécies de BAL *L. curvatus*, *W. confusa* e *L. lactis* foram identificadas em um grande número de amostras, podendo-se afirmar que a microbiota das salsichas é dominada por essas três espécies (Figura 1B). As bactérias das demais ordens foram observadas em no máximo duas das 44 amostras (Tabela 1). Enquanto isso, a espécie soja, do Reino Plantae, foi observada em todas as amostras.



**Figura 1:** Gêneros bacterianos pertencentes ao filo Firmicutes observados nas amostras (A) e espécies bacterianas do grupo de bactérias do ácido lático (B) presentes nas amostras de salsichas embaladas a vácuo e armazenadas a 5 °C e a 15 °C.

Além da abundância de BAL observada nas amostras, grande quantidade de DNA vegetal identificado como soja também foi encontrado nas salsichas. A legislação brasileira estabelece 4,0 % (m/ m) como a máxima quantidade de proteína vegetal que pode ser adicionada em salsichas (BRASIL, 200), e nas salsichas em estudo, segundo as informações do fabricante, a fração de proteína de soja é a máxima permitida, o que, certamente, potencializou a identificação de genes de soja em todas as amostras (Tabela 1).

Os materiais de origem vegetal identificados são interferentes importantes em estudos de metagenômica de matrizes alimentares de origem mista (vegetal e animal), como é o caso das salsichas em estudo, que contêm além dos ingredientes cárneos, uma considerável quantidade de proteína de soja (4,0 %) e condimentos também de origem vegetal. A presença de DNA vegetal interfere na reação de amplificação (PCR), pela possibilidade de competição

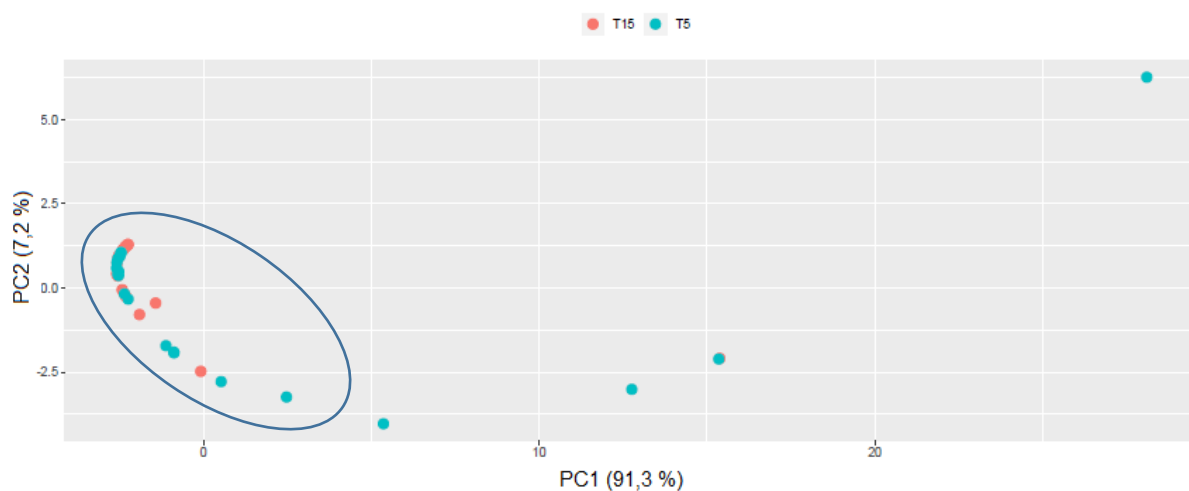
com o DNA bacteriano pelo iniciador, interferindo, conseqüentemente, no resultado do sequenciamento (CANKAR et al., 2006; THIJS et al., 2017). Gryson (2010) sugere que algumas condições às quais os alimentos são submetidos durante o seu processamento, como temperatura e pH, podem levar à degradação do DNA vegetal, dificultando a sua quantificação, o que vai contra o observado neste estudo onde grande parte dos táxons identificados (quase 16 %) são de origem vegetal (soja).

Os genes que codificam o rRNA 16S foram, e ainda são, muito usados para análises filogenéticas porque são distribuídos universalmente e suficientemente conservados, modificando-se lentamente ao longo da evolução dos organismos. Possivelmente o uso de outras regiões conservadas nos genomas dos organismos ao longo da evolução, que não V3-V4, como alvo para amplificação e sequenciamento seja uma estratégia viável para tentar reduzir a interferência de material genético de plantas em análises metagenômica cujo objetivo seja identificar táxons bacterianos. Em um estudo recente, Yang, Wang, & Qian (2016) avaliaram a sensibilidade filogenética das nove regiões hipervariáveis do gene ribossomal 16S (V1-V9) e verificaram que V4-V6 foram as regiões mais confiáveis no que se refere a representar o gene 16S rRNA em uma análise filogenética da maioria dos filos bacterianos, enquanto que V2 e V8 foram as regiões menos confiáveis. Um dos critérios estabelecidos pelos autores para selecionar quais regiões seriam mais representativas do comprimento total do gene 16S rRNA foi evitar seqüências pertencentes a cloroplastos e mitocôndrias, exatamente os interferentes neste estudo. Apesar do corriqueiro uso de regiões do gene ribossomal 16S, muito ainda se discute sobre a seleção de regiões hipervariáveis mais eficientes para análises filogenéticas e de classificação taxonômica de procariotos (YANG, WANG, & QIAN, 2016).

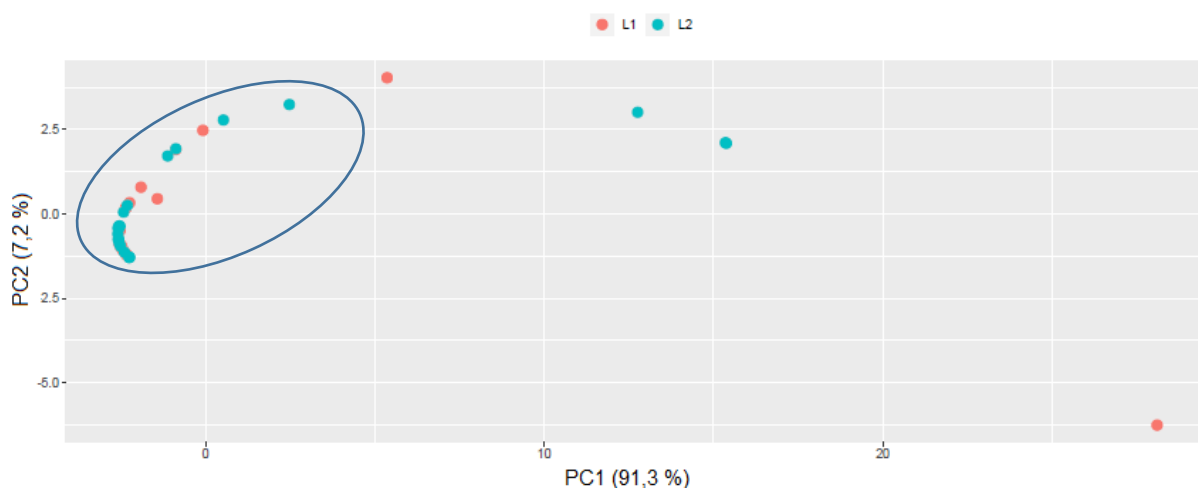
Genes informativos que codificam proteínas conservadas, como a proteína do choque térmico Hsp60 e como o fator TU de alongação da síntese proteica, podem ser eficientemente utilizados como alternativas ao gene ribossomal 16S para estudos filogenéticos de bactérias (LAWLEY et al., 2018). Outra possibilidade para tentar reduzir a interferência do DNA de interesse com DNA de plantas seria proceder algum tipo de processamento da amostra antes da extração do DNA total, como por exemplo a inoculação da amostra de salsicha e cultivo em placa das bactérias presentes e extração do DNA a partir de colônias observadas. Mas por outro lado, essa estratégia tende a limitar a identificação bacteriana, deixando de ser uma análise de metagenômica, uma vez que só são sequenciados genes de micro-organismos que estiverem viáveis e cultiváveis.

### **3.2. Análise comparativa dos metagenomas das salsichas**

Na análise de componentes principais (PCA) os conjuntos de dados são agrupados usando componentes que são combinações lineares das variações existentes nesses conjuntos (JOMBART, DEVILLARD & BALLOUX, 2010). Os táxons identificados foram agrupados por PCA, e gráficos bidimensionais para avaliar o efeito das diferentes temperaturas (Figura 2) e lotes (Figura 3) sobre a microbiota das salsichas foram gerados.



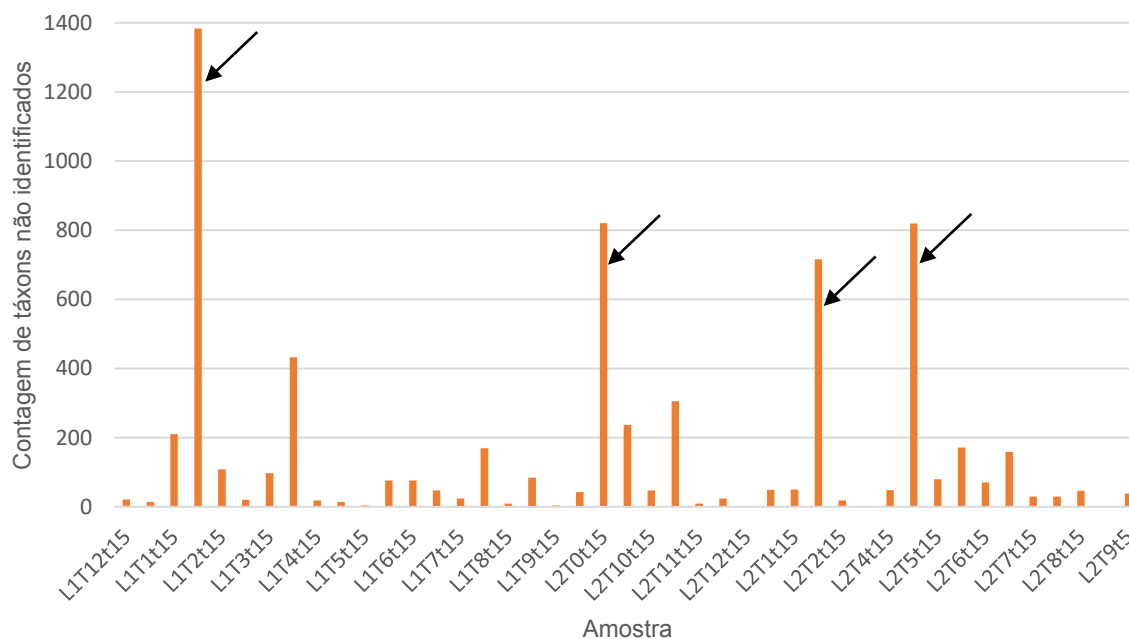
**Figura 2:** Gráfico de dispersão bidimensional dos componentes principais para as temperaturas de armazenamento 5 °C (T5) e 15 °C (T15).



**Figura 3:** Gráfico de dispersão bidimensional dos componentes principais para os diferentes lotes de fabricação (L1 e L2).

Nenhum dos componentes principais foram capazes de separar as amostras conforme os respectivos tratamentos (diferentes lotes e temperaturas de armazenamento), ou seja, as populações microbianas das salsichas em estudo não diferem entre si. Além da sobreposição de grande parte dos dados (Figuras 2 e 3), é possível observar alguns pontos isolados dos conjuntos. Esses pontos são considerados outliers e as altas contagens de sequências não

identificadas taxonomicamente (Figura 4) nestas amostras fazem com quem elas destoem do grupo, apresentando-se como outliers nos gráficos de PCA.



**Figura 4:** Contagens de sequências bacterianas desconhecidas presentes nas amostras. As amostras cujas barras estão indicadas com setas correspondem aos outliers observados nos gráficos de PCA.

L: lote; T: tempo de análise que vai de 0 a 12 (60 dias); t: temperatura de armazenamento das salsichas.

O PCA é um algoritmo matemático que reduz a dimensionalidade dos dados retendo a maior parte da variação existente no conjunto de dados (METSALU & VILO, 2015). Os gráficos de PCA são usados na pesquisa biológica por permitirem identificar as principais fontes de variação entre os conjuntos de dados. Ele identifica as direções (componentes) que explicam a variação existente no conjunto de dados, e por meio de poucos componentes, as amostras podem ser representadas em poucos pontos e plotadas em um gráfico. Desta forma é possível visualizar as similaridades e diferenças entre as amostras, e se elas podem ou não ser agrupadas (RINGNÉR, 2008; JOMBART, DEVILLARD & BALLOUX, 2010). Neste estudo, o PCA mostra que as amostras não podem ser agrupadas/ separadas, com base nos táxons identificados, ao se avaliar os efeitos de temperatura (Figura 2) e lote (Figura 3).

Quando não é possível separar os grupos de dados no gráfico de PCA, como neste estudo, diz-se que existe sobreposição entre os tratamentos. Isto é, não houve variação entre os grupos de organismos identificados que permita separar as amostras conforme os tratamentos aplicados, o que foi confirmado pelo teste t que não foi significativo ( $p > 0,05$ ).

A não observação de diferenças entre os lotes indica padronização no processo, incluindo as origens das matérias primas envolvidas na produção das salsichas. A padronização dos processos na indústria de alimentos é uma importante ferramenta que proporciona a redução na variabilidade dos produtos e envolve a uniformização tanto dos procedimentos operacionais, quanto das matérias-primas e equipamentos utilizados no processo de fabricação (TRIENEKENS, & ZUURBIER, 2008; SHIN, KIM, & HWANG, 2015).

Apesar da temperatura de armazenamento não ter influenciado ( $p > 0,05$ ) as microbiotas das salsichas em estudo, sabe-se que flutuações e a ocorrência de temperaturas abusivas é uma realidade na cadeia produtiva de alimentos com potencial para afetar a qualidade dos produtos (CAO et al., 2017). Embora haja esforço por parte da indústria em garantir a manutenção da cadeia do frio durante os processos de fabricação isso ainda constituiu um grande desafio. Muitas vezes é na etapa de distribuição dos produtos para o mercado consumidor, sob a qual a indústria não tem controle, que grandes flutuações de temperatura acontecem (POTHAKOS et al., 2015; KREYENSCHMIDT et al., 2010; WELCH & MITCHELL, 2000).

### 3.3. Sucessão bacteriana nas salsichas

A análise das populações bacterianas ao longo do tempo (Figuras 5 e 6) de armazenamento leva à percepção de diferenças na composição e abundância relativa dos micro-organismos que compõem as microbiotas das salsichas.

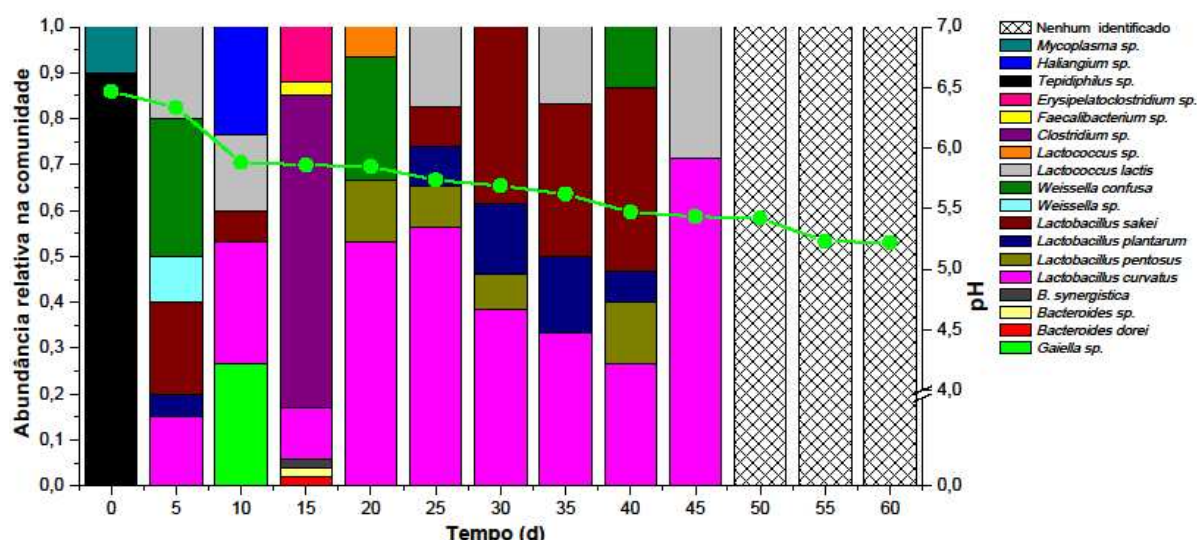
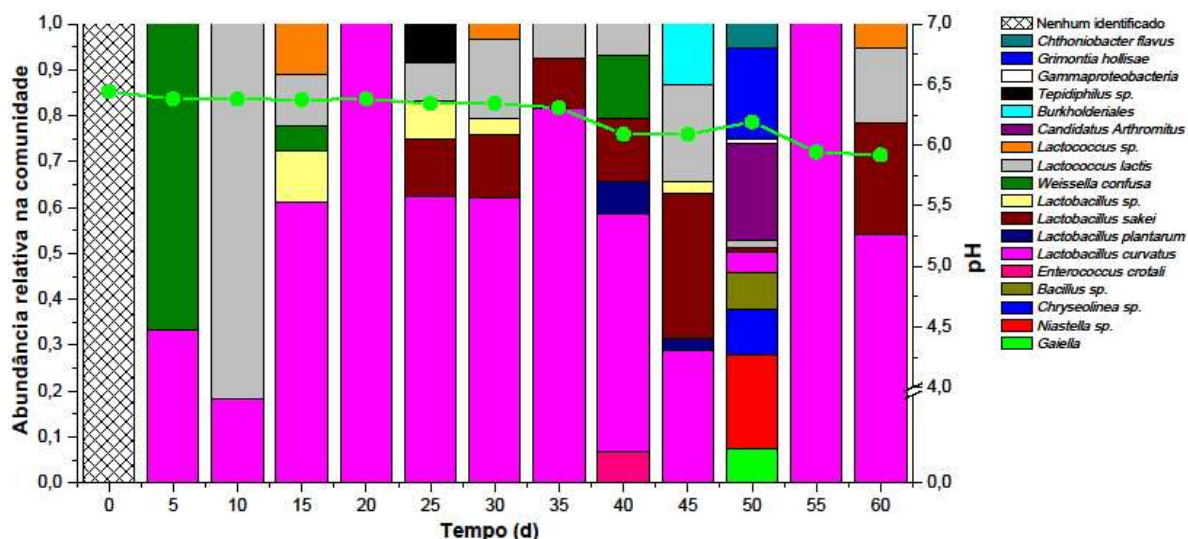


Figura 5: Sucessão bacteriana e pH nas salsichas armazenadas a 15 °C.



**Figura 6:** Sucessão bacteriana e pH nas salsichas armazenadas a 5 °C.

Uma complexa e variada sucessão bacteriana é observada em ambos os tratamentos (Figuras 5 e 6). As comunidades bacterianas identificadas nas salsichas em estudo, desde o tempo 0 até o final da vida útil, foram compostas por principalmente *L. curvatus*, *L. lactis* e *L. sakei*, tanto nas salsichas armazenadas a 5 °C quanto naquelas armazenadas a 15 °C. Este resultado corrobora com outros estudos de microbiomas de salsichas embaladas a vácuo e armazenadas sob refrigeração, pelo sequenciamento do gene 16S rDNA, nos quais diversas espécies do grupo das BAL foram identificadas nas amostras avaliadas, com predominância de *L. sakei* e *L. curvatus* (COCOLIN et al., 2007; HULTMAN et al., 2015; STELATTO et al., 2016). Apesar de as salsichas em estudo não serem um produto fermentado, as BAL, grupo mais abundante nas amostras inclui espécies típicas de produtos cárneos fermentados. Mas algumas espécies como *L. sakei* e *L. curvatus* são bem adaptadas a microambientes cárneos em geral (DE SOUZA BARBOSA et al., 2015). A contaminação por BAL e psicrotróficos em produtos cárneos refrigerados é proveniente da matéria-prima, do ambiente de processamento, de falhas na higienização de equipamentos, das condições de embalagem e armazenamento (SAMELIS, KAKOURI, & REMENTZIS, 2000).

O gradual decréscimo do pH observado nas salsichas ao longo dos dias é reflexo da produção de ácidos orgânicos como lático e acético, pela população de BAL presente (JANBEN et al., 2018). Observa-se em ambos os tratamentos, desde os tempos iniciais até os tempos finais de armazenamento, a predominância de espécies do gênero *Lactobacillus* (*L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. sakei*), tipicamente associadas com expressiva acidificação, promoção de odor desagradável e ainda, formação de limo em produtos cárneos embalados a vácuo (POTHAKOS et al., 2015; AUDENAERT et al., 2010; DOULGERAKI, et al., 2010).

Algumas espécies do gênero *Lactococcus*, apesar de estarem associadas a processos de fermentação de produtos lácteos, são tipicamente deterioradoras de produtos cárneos embalados a vácuo, bem como algumas espécies do gênero *Weissella* (JIANG et al., 2010; RAHKILA et al., 2012; SAKALA et al., 2002; ZHANG et al., 2012). Ainda dentro do grupo das BAL, o gênero *Enterococcus* verificado nos momentos finais de armazenamento a 5 °C das salsichas, são típicos de produtos cárneos deteriorados (BJÖRKROTH et al., 2005; KOORT et al., 2004). Apesar de as BAL serem associadas à deterioração de produtos cárneos refrigerados, este grupo tem a capacidade de inibir a multiplicação de outros micro-organismos, como patógenos e outros deterioradores, pela acidificação do meio e produção de bacteriocinas (FADDA et al., 2010; MANGIA et al., 2013).

Apesar de *L. curvatus*, *L. lactis* e *L. sakei* serem as mais abundantes e recorrentes espécies observadas nas amostras, ao se proceder uma comparação minuciosa das composições das microbiotas das salsichas em cada tempo, outros micro-organismos menos abundantes também podem ser observados (Figuras 5 e 6). Cao e colaboradores (2017) sugerem que tratamentos como refrigeração e embalagem em atmosfera modificada, usados com o intuito de aumentar a vida útil de muitos produtos alimentícios perecíveis tendem a promover consideráveis mudanças na microbiota dos alimentos, o que tem potencial para afetar a qualidade do produto. Embora embalagem a vácuo e armazenamento sob baixa temperatura sejam estratégias frequentemente combinadas na indústria de produtos cárneos com o objetivo de retardar a multiplicação microbiana, esta combinação tem potencial para proporcionar um efeito de pressão seletiva sobre os micro-organismos, selecionando aqueles psicrotópicos e anaeróbios (estritos ou facultativos), como é o caso das BAL predominantemente observadas nas salsichas neste estudo.

A literatura relata *Pseudomonas* sp. (aeróbios estritos) como o principal e, muitas vezes, micro-organismo deteriorador dominante em carnes e produtos cárneos armazenados sob aerobiose e refrigeração (ANDREANI & FASOLATO, 2017; HÖLL, BEHR, & VOGEL, 2016; ERCOLINI ET AL., 2006; LABADIE, 1999). Mas por outro lado, Stoops et al. (2012) afirmam que a remoção do oxigênio das embalagens de produtos alimentícios nem sempre é garantia de que espécies do gênero *Pseudomonas* tenham sua atividade deterioradora inibida no produto, havendo, portanto, a possibilidade de identificação de material genético deste grupo de micro-organismos em produtos embalados com ausência de oxigênio, como as salsichas. Mas apesar disso, neste estudo não foram observadas em nenhum dos lotes avaliados sequências genômicas

de espécies de *Pseudomonas*, nem mesmo após a perda total do vácuo nas embalagens a 15 °C, aparecendo como micro-organismos dominantes apenas as BAL.

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

Amostras de salsichas de diferentes lotes, embaladas a vácuo e submetidas a temperaturas de armazenamento ideais ou de abuso não apresentaram alterações estatisticamente significativas em seus metagenomas. Ao se observar a abundância relativa dos táxons identificados nas comunidades bacterianas, alguns micro-organismos permanecem dominantes em ambos os tratamentos, mas outros, em baixas quantidades, estão presentes em apenas um.

A presença de material de origem vegetal no produto mostrou ser um interferente no resultado do estudo, uma vez que grande parte das sequências genômicas identificadas correspondeu a esse material. Assim, novas estratégias para estudo de microbiota bacteriana nesse tipo de material, contendo ingredientes de origem vegetal em alta proporção, devem ser estudadas e exploradas a fim de reduzir estes interferentes e aumentar as chances de identificar os organismos de interesse.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDREANI, N. A.; FASOLATO, L. *Pseudomonas* and related genera. In **The Microbiological Quality of Food**, p. 25-59, 2017.

AUDENAERT, K.; D' HAENE, K.; MESSENS, K.; RUYSSSEN, T.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 12–18, 2010.

AXELSSON, L.; AHRNÉ, S. Lactic acid bacteria. In **Applied microbial systematics** (p. 367-388). Springer, Dordrecht, 2000.

BJÖRKROTH, J.; RISTINIEMI, M.; VANDAMME, P.; KORKEALA, H. Enterococcus species dominating in fresh modified-atmosphere-packaged, marinated broiler legs are overgrown by *Carnobacterium* and *Lactobacillus* species during storage at 6 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 267–276, 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça, de salsicha. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, DF, abril, 2000.

- CANKAR, K.; ŠTEBIH, D.; DREO, T.; ŽEL, J.; GRUDEN, K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR—effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnology**, v. 6, n. 1, 37 p., 2006.
- CAO, Y.; FANNING, S.; PROOS, S.; JORDAN, K.; SRIKUMAR, S. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. 1829, 16 p., 2017.
- COCOLIN, L.; DIEZ, A.; URSO, R.; RANTSIOU, K.; COMI, G.; BERGMAIER, I.; BEIMFOHR, C. Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 100-109, 2007.
- DE FILIPPIS, F.; PARENTE, E.; ERCOLINI, D. Metagenomics insights into food fermentations. **Microbial Biotechnology**, v. 10, p. 91–102, 2017.
- DE SOUZA BARBOSA, M.; TODOROV, S. D.; IVANOVA, I.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; DE MELO FRANCO, B. D. G. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food microbiology**, v. 46, p. 254-262, 2015.
- DOULGERAKI, A. I.; PARAMITHIOTIS, S.; KAGKLI, D. M.; NYCHAS, G. J. E. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1028–1034, 2010.
- ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; TORRIERI, E.; MASI, P.; VILLANI, F. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.7, p. 4663-4671, 2006.
- FADDA, S.; LÓPEZ, C.; VIGNOLO, G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. **Meat Science**, v. 86, p. 66-79, 2010.
- GANZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v.2, p. 106-117, 2015.
- GRYSON, N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2003-2022, 2010.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.
- HÖLL, L.; BEHR, J.; VOGEL, R. F. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. **Food microbiology**, v. 60, p. 84-91, 2016.
- HULTMAN, J.; RAHKILA, R.; ALI, J.; ROUSU, J.; BJÖRKROTH, K. J. Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and

- spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7088-7097, 2015.
- JANßEN, D.; EISENBACH, L.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. Assertiveness of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* in a fermented sausage model. **International journal of food microbiology**, 10 p., 2018.
- JIANG, Y.; GAO, F.; XU, X. L.; SU, Y.; YE, K. P.; ZHOU, G. H. Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE. **Meat Science**, v. 86, n. 4, p. 889–895, 2010.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 94-109, 2010.
- KATZ, M.; HOVER, B. M.; BRADY, S. F. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 129-141, 2016.
- KOORT, J.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; SUKURA, A.; BJÖRKROTH, J. *Enterococcus hermanni* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1823–1827, 2004.
- KREYENSCHMIDT, J.; HÜBNER, A.; BEIERLE, E.; CHONSCH, L.; SCHERER, A.; PETERSEN, B. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 510–520, 2010.
- LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, v. 52, n. 3, p. 299-305, 1999.
- LAWLEY, B.; CENTANNI, M.; WATANABE, J.; SIMS, I.; CARNACHAN, S.; BROADBENT, R.; TANNOCK, G. W. Tuf gene sequence variation in *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* detected in the fecal microbiota of Chinese infants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 13, 36 p., 2018.
- MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 2, p. 131-139, 2007.
- MANGIA, N. P.; TRANI, A.; DI LUCCIA, A.; FACCIA M.; GANBACORTA, G.; FABCELLO, F.; DIEANA, P. Effect of the use of autochthonous *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosum* strains on microbiological and biochemical properties of the Sardinian fermented sausage. **European Food Research & Technology**, v. 236, p. 557-566, 2013.
- METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic acids research**, v. 43, p. 566-570, 2015.

- MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G.; WORM, B. How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS biology**, v. 9, n. 8, 8 p., 2011.
- PATRA, J. K.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H. S. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 1493, 15 p., 2016.
- POTHAKOS, V.; DEVLIEGHERE, F.; VILLANI, F.; BJÖRKROTH, J.; ERCOLINI, D. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat science**, v. 109, p. 66-74, 2015.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- RAHKILA, R.; NIEMINEN, T.; JOHANSSON, P.; SÄDE, E.; BJÖRKROTH, J. Characterization and evaluation of the spoilage potential of *Lactococcus piscium* isolates from modified atmosphere packaged meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 50–59, 2012.
- RINGNÉR, M. What is principal component analysis? **Nature biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 303, 2008.
- RITARI, J.; SALOJÄRVI, J.; LAHTI, L.; DE VOS, W. M. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1056, 2015.
- SAKALA, R. M.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; KANEUCHI, C.; OGAWA, M. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 173–179, 2002.
- SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; REMENTZIS, J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 C. **Food Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 329-340, 2000.
- SHIN, D. H.; KIM, H.; HWANG, J. Standardization revisited: A critical literature review on standards and innovation. **Computer Standards & Interfaces**, v. 38, p. 152-157, 2015.
- STELLATO, G.; LA STORIA, A.; DE FILIPPIS, F.; BORRIELLO, G.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Overlap of spoilage microbiota between meat and meat processing environment in small-scale vs large-scale retail distribution. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 13, p. 4045–4054. , 2016.
- STELLATO, G.; UTTER, D. R.; VOORHIS, A.; DE ANGELIS, M.; EREN, A. M.; ERCOLINI, D. A few *Pseudomonas* oligotypes dominate in the meat and dairy processing environment. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. 264, 2017.
- STOOPS, J.; MAES, P.; CLAES, J.; VAN CAMPENHOUT, L. (2012). Growth of *Pseudomonas fluorescens* in modified atmosphere packaged tofu. **Letters in applied microbiology**, v. 54, n. 3, p. 195-202, 2012.

- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492-498, 2004.
- THIJS, S.; OP DE BEECK, M.; BECKERS, B.; TRUYENS, S.; STEVENS, V.; D. VAN HAMME, J.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J. Comparative Evaluation of Four Bacteria-Specific Primer Pairs for 16SrRNA Gene Surveys. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n. 494, 15p., 2017.
- TRIENEKENS, J.; ZUURBIER, P. Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. **International Journal of Production Economics**, v. 113, n. 1, p. 107-122, 2008.
- WELCH, R.W.; MITCHELL, P. C. Food processing: a century of change. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 1–17, 2000.
- WHITE, J. R.; NAGARAJAN, N.; POP, M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. **PLoS computational biology**, v. 5, n. 4, e1000352, 2009.
- WOOLEY, J. C.; YE, Y. Metagenomics: facts and artifacts, and computational challenges. **Journal of computer science and technology**, v. 25, n. 1, p. 71-81, 2010.
- YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, 135 p., 2016.
- ZHANG, Q. Q.; HAN, Y. Q.; CAO, J. X.; XU, X. L.; ZHOU, G. H.; ZHANG, W. Y. The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 208–214, 2012.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

A temperatura de armazenamento se mostrou um fator relevante na deterioração de salsichas. Apesar de apenas as salsichas a 15 °C terem apresentado mau odor e formação de limo, a elevada carga microbiana alcançada e a duplicação da acidez ao longo do armazenamento nas salsichas a 5 °C chama a atenção e deixa claro que o produto, mesmo sob temperatura ideal, estava se deteriorando, apesar de não ter apresentado alterações macroscópicas. A multiplicação mais lenta de BAL a 5 °C contribuiu para retardar o estresse populacional bacteriano que estimula a formação de limo no produto. A cor das salsichas não se alterou, independente da temperatura de armazenamento.

Apesar da interferência do material de origem vegetal presente nas salsichas nas reações de PCR e, conseqüentemente, nos resultados do sequenciamento, foi possível a identificação da diversidade bacteriana nas amostras. Amostras de salsichas de diferentes lotes, embaladas a vácuo e submetidas a temperaturas de armazenamento ideais ou de abuso não apresentaram alterações estatisticamente significativas em suas microbiotas bacterianas.