

LARA MARIA VIEIRA FLORES CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA DE CARNE BOVINA
EMBALADA A VÁCUO ARMAZENADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

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

Orientador: Luís Augusto Nero

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C331c
2022
Carvalho, Lara Maria Vieira Flores, 1996-
Caracterização da microbiota bacteriana de carne bovina
embalada a vácuo armazenada em diferentes temperaturas / Lara
Maria Vieira Flores Carvalho. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (79 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luis Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2022.

Referências bibliográficas: f. 50-79.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.647>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Carne de boi - Microbiologia. 2. Carne de boi -
Deterioração. I. Nero, Luis Augusto, 1975-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.0896

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

LARA MARIA VIEIRA FLORES CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA DE CARNE BOVINA
EMBALADA A VÁCUO ARMAZENADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

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

APROVADA: 29 de julho de 2022.

Assentimento:


Lara Maria Vieira Flores Carvalho
Autora


Luis Augusto Nero
Orientador

*A Deus, minha mãe, meus irmãos e à toda
minha família, que sempre me apoiaram em
tudo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Deus por me abençoar em todos os momentos, proporcionando saúde e forças para eu seguir fazendo o meu melhor.

À minha mãe, Roselaine, por ser meu refúgio, meu suporte e minha maior inspiração; por nunca me deixar desistir e por se fazer presente, mesmo de longe.

A meu irmão, Lorenzo, por alegrar meus dias e me motivar a continuar no caminho que escolhi.

À minha tia Nádia e à minha afilhada, Elisa, pelo carinho e companheirismo.

Ao meu padrasto, Adilson, por toda ajuda e incentivo.

À minha tia Angélica, por me apoiar sempre.

À toda minha família, por acreditar nos meus sonhos.

Aos amigos que estiveram comigo durante esses anos, por tornarem a jornada mais leve.

Ao meu orientador, professor Dr. Luís Augusto Nero, por compartilhar seus conhecimentos e confiar em meu trabalho, desde a graduação.

Ao meu coorientador, professor Dr. Ricardo Seiti Yamatogi, por auxiliar quando preciso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária, em especial, Sr. Luiz, Dagoberto, Batalha e Rose, por toda ajuda durante esses anos,

Às colegas de laboratório, Flaviana, Nayla, Francielly, Mirian e Rafaela, por serem sempre solícitas e se disporem a ajudar.

Aos estagiários, por contribuírem com a pesquisa e nos permitir repassar nossos aprendizados.

Ao meu parceiro, Caio, que esteve comigo desde o início do projeto, trabalhando de forma árdua para chegarmos ao melhor resultado.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e ter acesso a um ensino de alta qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

“A persistência é o caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

RESUMO

CARVALHO, Lara Maria Vieira Flores, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Caracterização da microbiota bacteriana de carne bovina embalada a vácuo armazenada em diferentes temperaturas.** Orientador: Luís Augusto Nero.

A embalagem a vácuo utilizada em produtos cárneos propicia uma atmosfera com menor nível de oxigênio, inibindo a multiplicação de alguns micro-organismos; entretanto, favorece outros grupos microbianos, como as bactérias anaeróbias. O presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota bacteriana da carne bovina embalada a vácuo armazenada a temperatura de 4°C e 15°C, ao longo de 28 dias, visando compreender a influência de fatores como tempo e temperatura de armazenamento sobre a composição bacteriana. As amostras foram analisadas imediatamente ao chegar ao laboratório (D0) e depois, em ambas as temperaturas, a cada 7 dias até o 28º dia. Mesófilos, enterobactérias e bactérias lácticas foram enumerados durante esse período. Além disso, a caracterização da microbiota bacteriana foi realizada a partir do sequenciamento de DNA 16S do exsudato cárneo obtido nos diferentes tempos e temperaturas. Apenas as amostras armazenadas a 15°C apresentaram desenvolvimento de deterioração *blown pack* e a contagem de mesófilos, enterobactérias e bactérias lácticas apresentou-se mais elevada também nessas amostras. Diferenças significativas entre as médias das contagens foram observadas tanto para tempo quanto para temperatura, de todos os grupos microbianos avaliados ($p < 0,05$). Através do sequenciamento do DNA total, observou-se que as amostras referências apresentaram prevalência de *Photobacterium*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Entretanto, durante o armazenamento, ocorreram alterações da microbiota. As amostras armazenadas à 15°C apresentaram prevalência inicial de *Hafnia-Obesumbacterium*, *Lactococcus* e, posteriormente, *Bacteroides*. *Clostridium* foi detectado, principalmente, nos últimos dias. Já a estocagem a 4°C manteve alta abundância relativa inicial de *Photobacterium* seguida por aumento de *Hafnia-Obesumbacterium* e *Lactococcus*. Nessa temperatura, também foi detectada a presença de *Yersinia*. Analisando-se os índices de diversidade alfa, observou-se que a diversidade microbiana foi significativamente diferente apenas no armazenamento a 15°C ($p < 0,05$). Além

disso, a composição microbiana foi se tornando mais homogênea, o que indica que a microbiota deteriorante passou a dominar o ecossistema e se sobressair em relação aos outros micro-organismos. Os dados obtidos reforçam a necessidade do monitoramento de produtos cárneos; visto que as bactérias estão, constantemente, se alterando, adaptando e criando novos mecanismos de sobrevivência. Dessa forma, têm-se diferentes grupos que conseguem se sobressair, de acordo com as barreiras impostas; sendo importante realizar avaliações para garantir a inocuidade e qualidade do produto final.

Palavras-chave: Carne Bovina. Inocuidade. Deterioração *blown pack*.

ABSTRACT

CARVALHO, Lara Maria Vieira Flores, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2022. **Characterization of the bacterial microbiota of vacuum-packed beef stored at different temperatures.** Adviser: Luís Augusto Nero.

Vacuum packaging used in meat products provides an atmosphere with a lower level of oxygen, inhibiting the multiplication of some microorganisms; however, it favors other microbial groups, such as anaerobic bacteria. The present study aimed to evaluate the bacterial microbiota of vacuum-packed beef stored at 4°C and 15°C, over 28 days, to understand the influence of factors such as storage time and temperature on bacterial composition. The samples were analyzed immediately upon arrival at the laboratory (D0) and then, at both temperatures, every 7 days until the 28th day. Mesophiles, enterobacteria, and lactic acid bacteria were enumerated during this period. In addition, the characterization of the bacterial microbiota was performed by sequencing 16S DNA from the meat exudate obtained at different times and temperatures. Only samples stored at 15°C showed development of *blown pack* deterioration and the count of mesophiles, enterobacteria, and lactic acid bacteria was also higher in these samples. Significant differences between the mean counts were observed for both time and temperature, for all microbial groups evaluated ($p < 0.05$). Through total DNA sequencing, it was observed that the reference samples showed a prevalence of Photobacterium, Pseudomonas, and Acinetobacter. However, during storage, there were changes in the microbiota. Samples stored at 15°C showed an initial prevalence of Hafnia-Obesumbacterium, Lactococcus, and, later, Bacteroides. Clostridium has been detected mainly in the last few days. Storage at 4°C maintained a high initial relative abundance of Photobacterium followed by an increase in Hafnia-Obesumbacterium and Lactococcus. At this temperature, the presence of Yersinia was also detected. Analyzing the alpha diversity indices, it was observed that the microbial diversity was significantly different only in storage at 15°C ($p < 0.05$). In addition, the microbial composition has become more homogeneous, which indicates that the deteriorating microbiota started to dominate the ecosystem and stand out from the other microorganisms. The data obtained reinforce the need for monitoring meat products;

since bacteria are constantly changing, adapting, and creating new survival mechanisms. In this way, different groups can stand out, according to the barriers imposed; it is important to carry out evaluations to ensure the safety and quality of the final product.

Keywords: Beef. Food safety. *Blown pack* deterioration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Deterioração alimentar	13
2.2. Condições de armazenamento	14
2.3. Influência do tempo e temperatura	15
2.4. Deterioração <i>blown pack</i>	16
2.5. Micro-organismos relacionados à deterioração <i>blown pack</i>	17
2.6. Mesófilos	18
2.7. Enterobactérias	19
2.8. Bactérias láticas	20
2.9. Importância de técnicas moleculares.....	22
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Amostragem e Preparo das Amostras.....	23
4.2. Análises de mesófilos	24
4.3. Análises de enterobactérias	25
4.4. Análises de bactérias láticas	25
4.5. Análises estatísticas	26
4.6. Caracterização da comunidade bacteriana.....	26
4.6.1. <i>Preparo de biblioteca e sequenciamento de DNA - 16S</i>	26
4.6.2. <i>Análises bioinformáticas</i>	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1. Informações gerais sobre o desenvolvimento de deterioração nas amostras	28
5.2. Análises de mesófilos	29
5.3. Análises de enterobactérias.....	33
5.4. Análises de bactérias láticas.....	35
5.5. Caracterização da Comunidade Bacteriana	38
5.5.1. <i>Composição bacteriana</i>	38
5.5.2. <i>Core microbiano</i>	44
5.5.3. <i>Alfa diversidade</i>	47
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Os animais possuem uma microbiota, naturalmente, variável, que pode ser introduzida no ambiente de abate e processamento, e através da contaminação cruzada chegar até os produtos finais, influenciando a qualidade ou mesmo a inocuidade dos alimentos de origem animal. Durante o processamento, os alimentos ficam sujeitos a contaminações e a manipulação inadequada pode ser considerada um dos principais fatores associados a esse processo. Nesse cenário, as bactérias se destacam com maior potencial deteriorante, devido à sua capacidade de multiplicar rapidamente, por utilizarem substratos variados e apresentarem diversos fatores de resistência diante diferentes condições (VALSECHI et al., 2006).

Produtos cárneos embalados a vácuo são amplamente consumidos pela população e foram, inicialmente, desenvolvidos visando uma preservação durante longos períodos. Tal embalagem propicia atmosfera com menor nível de oxigênio, o que inibe alguns micro-organismos, mas seleciona a multiplicação de outros, inclusive, potencialmente deteriorantes (STILES, 1996).

Muitos alimentos, incluindo a carne, apresentam uma microbiota complexa e diversificada; portanto, é essencial que ocorra um monitoramento desses grupos microbianos para garantir qualidade e inocuidade dos produtos desde a produção até o armazenamento (HÚNGARO et al., 2016). Dentre os micro-organismos relacionados ao desenvolvimento de deterioração em carnes, destacam-se bactérias lácticas (BAL) e enterobactérias. Em altos níveis, esses grupos costumam produzir amolecimento, inchaço, esverdeamento, mudanças de coloração e um limo esbranquiçado no produto final (METAXOPOULOS et al., 2002; COLLINS et al., 1992; BLICKSTAD, 1983).

As condições de armazenamento são fundamentais para evitar esse processo em produtos cárneos. Dessa forma, é importante que a carne bovina seja mantida a uma temperatura igual ou inferior a 4°C. As temperaturas mais baixas podem retardar significativamente o início da deterioração, no entanto, tal estratégia não se aplica quando o produto está contaminado com micro-organismos específicos, como *Clostridium estertheticum*, mas pouco se sabe sobre as outras espécies. Dessa forma, análises mais abrangentes da microbiota da carne bovina embalada a vácuo são importantes para melhor compreender a influência de fatores

como tempo como tempo e temperatura de armazenamento sobre a composição da microbiota desses produtos (MOSCHONAS et al., 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Deterioração alimentar

Os alimentos possuem diversos substratos, incluindo uma variedade de proteínas, aminoácidos, vitaminas, glicogênio, açúcar e gordura, bem como potencial redox negativo, valor de pH neutro a levemente ácido e elevada umidade, o que permite a multiplicação de diversos micro-organismos que podem causar a deterioração desses produtos (IACUMIN et al., 2021; HUIS IN'T VEL et al., 1996).

Dentre esses alimentos, os produtos cárneos se destacam como um dos mais perecíveis devido à sua composição rica em nutrientes (HÚNGARO et al., 2016). Tais características resultam em um produto suscetível à deterioração por enzimas e micro-organismos durante processamento, transporte, armazenamento e comercialização (MUCHENJE et al., 2009).

O Brasil se destaca no mercado de proteína animal e vem se mantendo como principal exportador mundial de carne bovina (USDA, 2021). Visto isso, é essencial seguir realizando um monitoramento eficaz, para que problemas como deterioração não afetem a qualidade do produto final. A deterioração da carne e, portanto, as mudanças em seu perfil microbiológico dependem de fatores intrínsecos e extrínsecos como pH, morfologia da superfície, disponibilidade de oxigênio, contaminação por bactérias deteriorantes em diferentes estágios do processo de produção e condições de armazenamento (ERCOLINI et al., 2010). A contaminação microbiana é o fator mais importante no processo de deterioração e destaca-se como um problema comum em países do mundo todo, causando grandes perdas econômicas. Além disso, muitos micro-organismos deteriorantes são patogênicos, incluindo algumas enterobactérias (espécies de *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Shewanella*, por exemplo) constituindo um problema de saúde pública (PALUMBO, 1986; HERNANDEZ-MACEDO et al., 2011).

Os agentes envolvidos nesse processo podem ser oriundos da matéria prima e se disseminar, principalmente, na fase de esfolagem e evisceração. Durante

cozimento ou pasteurização, o binômio tempo/ temperatura também pode não ser adequado para eliminar micro-organismos esporogênicos ou termorresistentes e, com armazenamento inadequado, essas bactérias podem se proliferar, levando à redução da vida útil do produto (IACUMIN et al., 2021). A deterioração é, comumente, caracterizada por mudanças na coloração e textura, odores desagradáveis, aumento da exsudação, produção de gás e limo, que ocorre quando a contagem bacteriana atinge, aproximadamente, 10^8 UFC/cm² (JONES et al., 2004; NYCHAS et al., 2007; HUIS IN'T VELD et al., 1996; GILL et al., 2000).

O processo de deterioração leva à redução da qualidade e valor nutricional, além de causar problemas relacionados à segurança alimentar. Ele ocorre, principalmente, devido à atividade microbiana, resultando em produção de gases (hidrogênio sulfurado, dióxido de carbono, metano e a amônia) e odor fétido (ORDONEZ, 2005). Também pode ocorrer devido à ação de enzimas endógenas, oxidação lipídica e formação de pigmentos. A carga inicial de micro-organismos na superfície da carne está, amplamente, relacionada à qualidade do produto final (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Além disso, dentre os fatores que mais influenciam o desenvolvimento da deterioração, destacam-se temperatura, tempo e atmosfera de armazenamento.

2.2. Condições de armazenamento

A população está cada vez mais consciente da importância da alimentação para a saúde e, portanto, qualquer questão relacionada à segurança alimentar tem um impacto considerável no comportamento do consumidor. Os consumidores estão cada vez mais interessados em adquirir produtos de alta qualidade, seguros, com menos aditivos, vida útil longa e fácil de preparar. Tendo isso em vista, a indústria da carne vem buscando tecnologias que possam suprir tais necessidades durante o processamento e armazenamento dos produtos (KORHONEN, 2002; RAGAERT et al., 2004).

As atmosferas modificadas são um dos sistemas de preservação que estão sendo cada vez mais empregados (NADON et al., 2001; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005; RUIZ-CAPILLAS et al., 2011). Embora possam ser

aplicadas de várias maneiras, tradicionalmente, os produtos à base de carne têm sido embalados para o varejo nessas embalagens (CHURCH e PARSONS, 1995; RUIZ-CAPILLAS e JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005). Normalmente, os gases usados em embalagens de carnes são CO₂ com O₂ ou N₂ misturados em diferentes proporções (FRAQUEZA et al., 2008; MOSTARDINI e PIERGIOVANNI, 2002).

Além da embalagem de “atmosfera modificada”, a embalagem a vácuo em combinação com refrigeração é um dos métodos mais difundidos para retardar a deterioração de produtos cárneos. A embalagem não apenas atua como uma barreira contra contaminantes mas também desempenha um papel crucial na seleção de micro-organismos deteriorantes devido ao seu efeito na disponibilidade de oxigênio. Do grande grupo de micro-organismos que, inicialmente, colonizam o ecossistema, algumas bactérias lácticas e enterobactérias são favorecidas. Apesar dessa biodiversidade, no produto final predominam apenas alguns grupos bacterianos que são, altamente, competitivos, capazes de se multiplicar e superar outros micro-organismos (CURIEL et al., 2011).

2.3. Influência do tempo e temperatura

As condições adequadas de armazenamento são essenciais para evitar a deterioração dos produtos cárneos. Visto isso, sabe-se que a carne bovina fresca deve ser mantida a uma temperatura igual ou inferior a 4°C; entretanto, durante transporte e entrega (principalmente, no carregamento e descarregamento), pode ocorrer uma exposição desses produtos a temperaturas mais elevadas e resultar em contaminações, até mesmo, por micro-organismos patogênicos (EL SHEIKHA; 2015; MERCIER et al., 2017). Além disso, nem sempre é possível manter a temperatura interna do veículo de transporte abaixo de 4°C durante todo o processo.

Conforme estudos realizados por Choi (2020), a contaminação bacteriana é influenciada diretamente pelo tempo e temperatura de armazenamento, ou seja, vai ocorrendo uma alteração da composição, diversidade e abundância da microbiota. Em temperaturas acima de 4°C, a quantidade total de bactérias presente na carne é maior, além disso, ocorrem mudanças mais significativas na interação entre os micro-organismos, o que pode resultar no processo de deterioração.

O armazenamento da carne em temperaturas mais baixas pode atrasar significativamente o início da deterioração. No entanto, tal estratégia não se aplica quando o produto está contaminado com alguns micro-organismos específicos, como *Clostridium estertheticum*, que possui característica psicotrófica, ou seja, é capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. Visto isso, é necessário realizar uma análise mais abrangente da microbiota da carne bovina embalada a vácuo armazenada em diferentes temperaturas, visando compreender mais sobre a influência desse fator sobre a composição bacteriana (MOSCHONAS et al., 2009).

2.4. Deterioração *blown pack*

A deterioração por estufamento da embalagem de carnes refrigeradas embaladas a vácuo, conhecida como deterioração *blown pack* (DBP), é caracterizada por grande produção de gás induzindo a distensão da embalagem (JONES & WOODS, 1986). A formação de gás leva a problemas tecnológicos no produto final e é resultado de atividades microbianas em carne crua ou cozida, sendo uma das características que mais contribuem para a DBP em carnes. O gás formado em embalagens com DBP é composto, principalmente, por CO₂ e H₂, sendo que CO₂ predomina no espaço superior das embalagens e O₂ apresenta-se de forma indetectável. Além disso, compostos voláteis, como ácido butanóico, 1-butanol, dissulfeto de dimetila, ácido acético, 3-metil-1-butanol, nonanal, benzaldeído, 1-octeno-3-ol, ácido acético e 1-hexanol podem servir como marcadores para DBP no caso de carne embalada a vácuo. O volume dessas embalagens pode atingir quase o dobro das amostras normais e o pH é significativamente menor (HERNANDEZ-MACEDO et al. 2011; LI et al., 2020). Produtos com esse tipo de deterioração não são aceitos pelo mercado consumidor devido a suas características sensoriais, o que resulta em grandes prejuízos econômicos para a indústria (WAMBUI et al., 2019).

A primeira pesquisa sobre DBP em carnes foi conduzida nos EUA (DAINTY et al., 1989) e, mais tarde, no Reino Unido (KALCHAYANAND et al., 1989), Nova Zelândia (BRODA et al., 2000), Irlanda (BYRNE et al., 2009) e Brasil (SILVA et al., 2011). Portanto, sabe-se que esse problema afeta a indústria de carne em escala

global. Atualmente, a pesquisa sobre esse tipo de deterioração é focada, principalmente, em produtos cárneos embalados a vácuo e alimentos fermentados, devido à presença de um ambiente propício para ocorrência desse processo (NIU et al., 2020). No entanto, ainda são necessários mais indicadores para auxiliar no desenvolvimento de medidas de controle desse tipo de deterioração em produtos cárneos.

2.5. Micro-organismos relacionados à deterioração *blown pack*

A deterioração *blown pack*, geralmente, acontece antes da data de vencimento da carne resfriada, mesmo em condições adequadas de embalagem e armazenamento. Os principais agentes relacionados a esse processo em carnes embaladas a vácuo são *Clostridium spp.*, micro-organismos psicrótróficos (DORN-IN et al., 2018; REID et al., 2017). Contudo, o grande número de enterobactérias em alimentos deteriorados também revela uma possível causa desse problema. Esse grupo bacteriano costuma contaminar facilmente a carcaça após o abate, principalmente, se o intestino for rompido, durante evisceração e através de manipulações inadequadas (HEIR et al., 2012).

A população bacteriana psicrófila presente em produtos deteriorados também é representada por bactérias láticas, incluindo *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella viridescen*, enquanto *Pseudomonas*, raramente, está envolvida nesse mecanismo. Dependendo do tipo de embalagem, BAL e enterobactérias costumam produzir amolecimento, inchaço, esverdeamento, alterações na cor e um limo esbranquiçado (METAXOPOULOS et al., 2002, COLLINS et al., 1992; BLICKSTAD, 1983).

As bactérias láticas, frequentemente, constituem a maior parte da comunidade bacteriana relacionada à deterioração. Apesar das enterobactérias também estarem, comumente, presentes, seus números, geralmente, permanecem mais baixos em relação aos de BAL. No entanto, enterobactérias podem desempenhar um papel fundamental na deterioração da carne devido à sua capacidade de metabolizar aminoácidos em compostos voláteis de odor

desagradável, como diaminas de odor fétido e compostos sulfúricos. Além disso, a família Enterobacteriaceae inclui patógenos, portanto, sua presença pode comprometer a inocuidade dos produtos, principalmente, se a carne for mal cozida ou manuseada de forma inadequada (BORCH et al., 1996; SAMELIS, 2006).

Como a carne utilizada para desenvolvimento do produto final pode estar contaminada por uma variedade de micro-organismos, a predominância de grupos específicos depende de determinantes ambientais (HÚNGARO et al., 2016; DOULGERAKI et al., 2012). A multiplicação desses micro-organismos é influenciada, diretamente, pela temperatura de armazenamento e disponibilidade de oxigênio (ERCOLINI et al., 2010; STAMATIOU et al., 2006). A atmosfera promovida por embalagens a vácuo elimina o risco de condições aeróbias mas permite a multiplicação dos micro-organismos anaeróbicos ou microaerofílicos (PENNACCHIA et al., 2011; BRIGHTWELL et al., 2007; SILVA et al., 2011).

2.6. Mesófilos

O monitoramento e a identificação da contaminação bacteriana em cada etapa de fabricação de alimentos é necessário para otimizar as condições de processamento e a qualidade final dos alimentos. Para isso, os testes microbiológicos são baseados principalmente em métodos de cultura (SALAM et al., 2013).

O grupo de aeróbios mesófilos é constituído por micro-organismos que se multiplicam à temperatura ambiente, principalmente, entre 20°C a 40°C (SAEKI; MALSUMOTO, 2010). A contagem desses micro-organismos é considerada um indicador de qualidade em alimentos, visto que reflete a qualidade da matéria prima, condições de manipulação, processamento e armazenamento (GOULART et al., 2020). Além disso, é uma ferramenta de baixo custo e consiste em uma técnica simples, que pode ser facilmente executada em laboratórios (SANT'ANA et al., 2002).

Contagens elevadas desses micro-organismos podem causar alterações indesejadas em alimentos, como carnes, levando ao desenvolvimento de deterioração nos produtos finais, além de aumentar, consideravelmente, a possibilidade de contaminação por patógenos. Devido aos potenciais riscos à saúde

pública que alimentos podem oferecer, é fundamental garantir que produtos seguros cheguem até o consumidor. Dessa forma, torna-se necessário um conjunto de procedimentos que viabilizem a qualidade e inocuidade desses produtos, abrangendo desde boas práticas de fabricação, manipulação e armazenamento até a entrega do produto final (SILVA et al., 2017).

2.7. Enterobactérias

Estudos revelam que membros da família Enterobacteriaceae também podem ser agentes determinantes do processo de deterioração em carne, inclusive, deterioração *blown pack*. Esses micro-organismos já foram detectados em amostras cárneas deterioradas, independentemente, até mesmo da presença de *Clostridium* (BRODA et al, 2000; BRIGHTWELL et al., 2007). Nesse contexto, sabe-se que uma variedade de enterobactérias pode multiplicar-se em carnes resfriadas, por exemplo, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Rahnella* spp., *Serratia* spp., *Buttiauxella* e *Yersinia enterocolitica*, sendo, frequentemente, relatadas no final do armazenamento refrigerado. Dentre esses micro-organismos, *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens* e *Pantoea agglomerans* destacam-se no desenvolvimento direto da deterioração e de características sensoriais indesejáveis, como odores desagradáveis, distensão gasosa de embalagens a vácuo e descoloração verde (DAINTY et al., 1989; BRIGHTWELL et al., 2007). Os dados disponíveis indicam que o pH da carne, as condições de armazenamento e embalagem afetam a multiplicação, a diversidade e o potencial de deterioração de espécies de enterobactérias (BORCH et al., 1996; DOULGERAKI et al., 2012).

Além disso, o ambiente modificado presente em embalagens de “atmosfera modificada” ou embalagens a vácuo também afetam a seleção de enterobactérias: altos níveis de oxigênio associados a baixas temperatura de armazenamento proporciona vantagem competitiva para *Serratia* spp., por exemplo, enquanto *Hafnia alvei* predomina na carne armazenada em condições anaeróbicas ou em condições aeróbicas em temperaturas elevadas (DOULGERAKI et al., 2011).

A origem desses micro-organismos está associada a várias fontes. Fatores como poeira, água e fezes podem ficar aderidos à pele dos animais, sendo

consideradas fontes de contaminação primária da carcaça por micro-organismos desse grupo (BOEREMA et al., 2003). Além dos próprios animais, o ambiente de produção também vem sendo relatado como fonte desses micro-organismos (GRIMONT e GRIMONT, 2006; JANDA, 2006). Conseqüentemente, eles podem entrar na cadeia de processamento da carne e atuar como contaminantes de carcaças e superfície de equipamentos, o que representa potenciais riscos, visto que além de deteriorantes, a família Enterobacteriaceae inclui patógenos (STILES e NG, 1981).

2.8. Bactérias lácticas

Muitos micro-organismos do grupo de bactérias lácticas são conhecidos por conferir funções probióticas, ou seja, são micro-organismos vivos presentes em alimentos, cuja ingestão traz benefícios à saúde humana: inibindo bactérias intestinais indesejáveis, ativando imunidade humoral e celular, liberando vitaminas, aumentando digestibilidade da lactose, dentre outros. Além disso, seu efeito lipolítico e esterolítico é muito alto em relação a diversos grupos bacterianos. Dessa forma, em quantidades ideais, são consideradas tecnologicamente fundamentais, contribuindo para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis e aumento da vida de prateleira de produtos de origem animal, principalmente, alimentos fermentados. Entretanto, se o produto não for processado adequadamente, podem ocorrer contaminações, que levam à multiplicação exacerbada de tais micro-organismos e podem resultar na deterioração do alimento, trazendo sabores indesejáveis e até mesmo risco para saúde do consumidor (KROCKEL, 2013; COPPOLA e TURNES, 2004).

Nesse contexto, sabe-se que bactérias lácticas são consideradas um dos grupos bacterianos predominantes na deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo (BJORKROTH et al., 1998; CHENOLL et al., 2007). A multiplicação desses micro-organismos causa tipos específicos de deterioração em alguns alimentos, como diminuição do pH, odores ácidos, sabores desagradáveis, perda de vácuo, produção de exsudato branco e limo, reduzindo o tempo de prateleira desses produtos. Além disso, são capazes de produzir uma quantidade considerável de compostos bioativos relacionados a efeitos adversos agudos à saúde, como

aminas biogênicas, especialmente, tiramina e histamina (SCHILLINGER e LUCKE, 1987).

Poucos estudos abordam a origem ambiental das BAL encontradas na carne. A contaminação cruzada dos produtos finais por essas espécies é explorada baseando-se em uma disseminação por superfícies (VIHAVAINEN e BJORKROTH, 2009). Dessa forma, a microbiota natural de carne crua não processada é introduzida nas instalações de produção e pode se transformar em microorganismos residentes, contaminando ferramentas e superfícies de manipulação, onde são, geralmente, transferidos para carne fresca, produtos intermediários e/ou finais (DE FILIPPIS, LA STORIA, VILLANI & ERCOLINI, 2013). Esses microorganismos colonizam o local, persistem no ambiente através da formação de biofilmes e, dessa forma, contaminam os próximos lotes de produção. Portanto, o ambiente de processamento pode ser uma importante fonte de contaminação de BAL para carnes (VIHAVAINEN e BJORKROTH, 2009).

Em carnes armazenadas em condições anaeróbias, alguns gêneros de BAL se destacam como importantes agentes deterioradores. Particularmente, *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp. e *Leuconostoc* spp., que vêm sendo associados à deterioração de carne crua refrigerada ao longo do armazenamento com disponibilidade reduzida de oxigênio (LABADIE, 1999; LAMBERT et al., 1991).

Embora *Lactococcus* esteja, geralmente, associado a processos de fermentação láctea, algumas espécies também causam deterioração em carne, como *Lactococcus piscium* e *Lactococcus raffinolactis* (Rahkila et al., 2012). Dentre as espécies de *Lactobacillus*, destacam-se *Lactobacillus sakei*, que foi, amplamente, associado à deterioração tanto em carnes embaladas a vácuo quanto em embalagens de “atmosfera modificada” (CHENOLL et al., 2007; ERCOLINI et al., 2006a, 2010); seguido por *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus fuchuensis*, que também apresentaram altas contagens em amostras cárneas estocadas nessas mesmas condições (SCHILLINGER e LUCKE, 1987; SHAW e HARDING, 1984).

Pesquisas revelam que, durante armazenamento a vácuo a 4°C, *Lactobacillus algidus* e *Lactobacillus sakei* predominam. Já na estocagem a 1°C, foi identificada maior prevalência de *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp. e *Lactobacillus mesenteroides*, sugerindo a influência da temperatura no desenvolvimento de diferentes espécies sob as mesmas condições de embalagem. *Carnobacterium*

divergens também tem sido detectado em carnes armazenadas em diferentes condições e é, comumente, associado à deterioração da carne (AXELSSON, 2004; ERCOLINI et al., 2009; JONES, 2004).

BAL constitui um grupo bacteriano que pode atuar de duas formas distintas: servindo como agente bioprotetor ou contribuindo para a deterioração em alimentos, através da geração de metabólitos ofensivos e subsequente degradação organoléptica da carne. Assim, é importante que a diferenciação entre os biotipos seja promovida através de pesquisas, que determinem o potencial de deterioração como uma característica de cepas específicas (MAKSIMOVIC et al., 2018).

2.9. Importância de técnicas moleculares

A presença de micro-organismos deteriorantes em produtos cárneos processados, muitas vezes, pode não ser comprovada por métodos de cultura convencionais. Além disso, consome tempo, uma vez que alguns micro-organismos podem se multiplicar lentamente e ser inibidos por outros agentes durante o enriquecimento. Visto isso, técnicas moleculares de maior sensibilidade e especificidade se tornam necessárias para identificar micro-organismos relacionados à deterioração e trazer informações mais aprofundadas sobre a microbiota desses produtos (DORN-IN et al., 2018).

Tais técnicas possuem grande importância na garantia de segurança dos alimentos e vêm sendo incorporadas para monitorar processos produtivos no mundo todo (OYARZABAL; KATHARIOU, 2014). Nesse contexto, destaca-se o sequenciamento de DNA, o qual possui alto rendimento e permite a obtenção de informações mais completas sobre o ecossistema bacteriano (DEVASIA et al., 2019).

Esse método baseia-se na determinação da sequência de nucleotídeos (A, T, C e G) em um fragmento específico de DNA. Para realizar tal processo, foram desenvolvidas plataformas que utilizam diferentes metodologias e ferramentas computacionais, possibilitando análises bioinformáticas (SANGER, 1977; REUTER; 2015; KULSKI; 2016; NIGAM, 2018). Dentre as metodologias existentes, o sequenciamento do gene 16S rRNA (universal em bactérias) é, amplamente,

empregado para identificar espécies bacterianas presentes em amostras alimentares (DOULGERAKI, 2012; B AYLIS, 2006; ERCOLINI, 2004; HUGENHOLTZ et al.,

1998). Em geral, esse sequenciamento permite a diferenciação entre gêneros dos principais filos de bactérias, mas pode ocorrer da sequência obtida se relacionar com mais de uma espécie, por serem sequências iguais ou muito semelhantes (CLARRIDGE, 2004).

Essa ferramenta possui alta precisão e eficácia para realizar a caracterização da microbiota de alimentos. Além disso, possui diversas outras aplicações, podendo ser empregada para estudos epidemiológicos (OYARZABAL; KATHARIOU, 2014), identificação de patógenos e toxinas produzidas por bactérias de origem alimentar (OYARZABAL; KATHARIOU, 2014), biofilmes (GOMEZ-ALVAREZ, 2014), fraudes em alimentos (HAYNES et al., 2019; XING et al., 2019), dentre outras.

Visto isso, o sequenciamento total de DNA de produtos cárneos embalados a vácuo durante o armazenamento é uma ferramenta essencial para compreender a influência de fatores como tempo e temperatura de armazenamento sobre a microbiota e o desenvolvimento de deterioração desses produtos.

3. OBJETIVOS

O presente estudo objetivou avaliar a influência do tempo e temperatura de armazenamento de carne bovina embalada a vácuo sobre a microbiota bacteriana, através da enumeração de mesófilos, enterobactérias e bactérias lácticas; além do sequenciamento de DNA 16S do exsudato das amostras cárneas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem e Preparo das Amostras

Um total de 10 amostras de acém bovino embaladas a vácuo foram obtidas em um frigorífico na região da Zona da Mata de Minas Gerais e encaminhadas para o Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal — InsPOA. Cada peça foi, assepticamente, fracionada em porções de 400 gramas e embalada a vácuo, sendo

que metade das porções foram armazenadas a 4°C e a outra metade a 15°C. Posteriormente, as amostras foram analisadas a cada 7 dias até o 28º dia, para avaliar a influência do tempo e temperatura de estocagem na microbiota do produto. Além disso, uma amostra de cada peça foi analisada imediatamente após chegar do frigorífico, sem nenhum armazenamento adicional (identificada como amostra referência). A **Tabela 1** ilustra o esquema:

Tabela 1 – Tempo e temperatura de armazenamento das amostras.

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO	PERÍODO DE ARMAZENAMENTO (DIAS)			
-	Imediatamente após chegada do frigorífico			
4°C	7	14	21	28
15°C	7	14	21	28

Porções de 25 gramas foram, assepticamente, coletadas de cada amostra, diluídas em 225 mL de água peptonada tamponada 0,1%, homogeneizadas em *stomacher* e diluídas em escala seriada decimal utilizando água peptonada tamponada 0,1% como diluente.

4.2. Análises de mesófilos

Foram selecionadas alíquotas de diluições das amostras nos diferentes tempos e temperaturas, e semeadas *pour plate* em *Plate Count Ágar* (PCA) (*Difco – Becton Dr. Franklin Lakes, New Jersey, United States*). O protocolo adotado foi o método de plaqueamento *ISO 4833-1:2013, pour plate*, no qual as placas foram incubadas a 30º por 72 horas e, após esse período, as leituras foram realizadas para contagem bacteriana.

4.3. Análises de enterobactérias

Diluições das amostras foram selecionadas a partir de cada tempo e temperatura, e inoculadas em 10 mL de Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG) (*Oxoid - Basingstoke, Hampshire, Reino Unido*) para enterobactérias. Foi utilizada a técnica de plaqueamento *ISO 21528-2:2004, pour plate* com 10 mL de meio e, após completa solidificação do ágar, a placa foi coberta com uma sobrecamada de 15 mL do mesmo meio. Posteriormente, as placas foram incubadas na posição invertida a 37°C por 24 horas.

Colônias típicas de enterobactérias (vermelha púrpura, 0,5 mm ou mais de diâmetro e rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares) foram enumeradas após o período de incubação. Posteriormente, para confirmação, 861 colônias características foram selecionadas e submetidas ao teste de oxidase e fermentação de glicose.

No teste de fermentação de glicose, cada cultura foi inoculada com uma agulha em um tubo contendo glicose. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas com as tampas ligeiramente afrouxadas para manter condições aeróbicas. O crescimento com viragem para amarelo (viragem ácida do indicador) sugeria fermentação de glicose, sendo que enterobactérias fermentam glicose.

O teste de oxidase (*HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.*) foi realizado tocando e espalhando as culturas selecionadas no disco de oxidase. Quando houve mudança na coloração em até 10 segundos, o teste foi considerado positivo. Ao fim dos procedimentos, as culturas oxidase negativas com capacidade de fermentar glicose foram confirmadas como enterobactérias.

4.4. Análises de bactérias lácticas

Alíquotas de diluições de cada amostra foram selecionadas e semeadas pelo método de plaquamento *ISO 15214/1998, pour plate* em Ágar *DeMan Rogosa & Sharpe* (*Oxoid - Basingstoke, Hampshire, Reino Unido*), com pH ajustado a 5,7. As placas foram incubadas invertidas a 30°C por 72 horas em ambiente anaeróbico. Para obtenção de atmosfera anaeróbica, foram utilizados jarros com sistemas

geradores de anaerobiose (*BD Biosciences GasPak Anaerobic Systems*). Após incubação, as leituras foram realizadas para enumeração de colônias.

As placas foram submetidas à contagem de colônias e, posteriormente, à coloração de Gram, análise de morfologia e teste de catalase. As bactérias que apresentaram cor roxa na coloração de Gram foram consideradas Gram-positivas e as róseas, Gram-negativas. Para o teste de catalase, uma alçada do isolado da cultura foi colocada sobre uma lâmina e, posteriormente, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% foi adicionada. A formação de bolhas de ar indicou resultado positivo para catalase. As culturas Gram-positivas e catalase negativas foram confirmadas como bactérias lácticas.

4.5. Análises estatísticas

Para avaliar se havia diferença significativa entre as amostras para tempo e temperatura, foi realizada análise de variância (ANOVA), utilizando o teste F e teste de Tukey para comparação de médias a 5% de probabilidade. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o pacote estatístico R [R versão 4.0.3 (2020-10-10)].

4.6. Caracterização da comunidade bacteriana

4.6.1. Preparo de biblioteca e sequenciamento de DNA - 16S

Para pesquisas de diversidade genética, foi realizado o sequenciamento do DNA total a partir do exsudato das amostras cárneas. Alíquotas do exsudato, provenientes das amostras estocadas em ambas as temperaturas, foram selecionadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 e enviadas em tubos *NeoSampleZ* (*Neopropecta - Florianópolis, SC, Brasil*) para *Neopropecta*, onde foi realizada a extração de DNA e sequenciamento total *de DNA 16S*.

No preparo de biblioteca para sequenciamento de *amplicons* de bactérias, foi utilizado os *primers 341F* e *806R*, específicos para a região V3/V4 do gene 16S rRNA, em um protocolo de PCR de duas etapas. As reações de PCR foram realizadas utilizando *Platinum Taq (Invitrogen - Waltham, Massachusetts, EUA)*. Para o PCR 1, as condições foram: 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 45

segundos; 55°C por 30 segundos; 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por 2 minutos. Já para o PCR 2, adotou-se a temperatura de 95°C por 5 minutos; 10 ciclos de 95°C por 45 segundos; 66°C por 30 segundos; 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por 2 minutos. Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata.

As reações finais de PCR foram purificadas utilizando *Neobeads*[®] (*Beads* magnéticas à base de *Sera-Mag*[™]) e um volume equivalente de cada amostra foi adicionado ao *pool* de sequenciamento. Em cada rodada de PCR, um controle negativo de reação (CNR) foi incluído. Para cada ordem de recebimento (OR) foi também incluído um controle negativo de extração (CNE). A concentração final de DNA do *pool* de bibliotecas foi estimada através de ensaios utilizando *Picogreen dsDNA* (*Invitrogen*) e, em seguida, foi diluída para quantificação por qPCR utilizando o Kit de Quantificação de Biblioteca *Collibri*[™] (*Invitrogen*) já otimizado para bibliotecas *Illumina* (*San Diego, Califórnia, EUA*). O *pool* de sequenciamento foi ajustado para uma concentração final de 11 pM (para kits V2) ou 17,5 pM (para kits V3) e sequenciado no sistema *MiSeq* (*Illumina*), empregando os *primers* de sequenciamento fornecidos com o kit do fabricante. As corridas *paired-end* foram realizadas utilizando kits de sequenciamento V2x500 ou V3x600 (*Illumina*) com 10mil *reads* de cobertura por amostra.

4.6.2. Análises bioinformáticas

As análises de metataxonômica foram realizadas utilizando os *reads* (R1) para processamento no ambiente *Qiime2* (BOLYEN et al., 2019). Brevemente, as leituras foram processadas com o *plugin dada2* (CALLAHAN et al., 2016) para remoção e derreplicação de quimeras. A taxonomia foi atribuída à região V3/V4 do gene 16S rRNA do banco de dados 99% SSU NR obtido do repositório SILVA (QUAST et al., 2013). Os dados processados de ASVs (variantes de sequência de amplicon) foram importados para o ambiente RStudio usando o pacote R *qiime2R* (JORDAN & BISANZ, 2018). A visualização de dados foi gerada usando pacotes de microbioma dedicados, como *phyloseq* (MCMURDIE & HOLMES, 2013), *qiime2R* (JORDAN & BISANZ, 2018) e *microbiomeutilities* (SHETTY & LAHTI, 2019). A análise estatística foi realizada por meio do teste de Wilcox para comparar as

médias das diversidades alfa de fermentação. Os *reads* brutos foram disponibilizados no banco de dados *NCBI BioProject* (SubmissionID: SUB1159364; BioProject ID: PRJNA847946).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Informações gerais sobre o desenvolvimento de deterioração nas amostras

Dentre as 10 amostras analisadas, nove apresentaram desenvolvimento de deterioração *blown pack* (DBP), sendo que esse processo ocorreu apenas no armazenamento a 15°C, iniciando-se, principalmente, entre o 14º e 21º dia. Estudos mostram que a baixa temperatura é o fator mais significativo em retardar a deterioração microbológica em produtos cárneos embalados a vácuo (BELL et al., 2001; BOEREMA et al., 2007), o que corrobora com os dados apresentados.

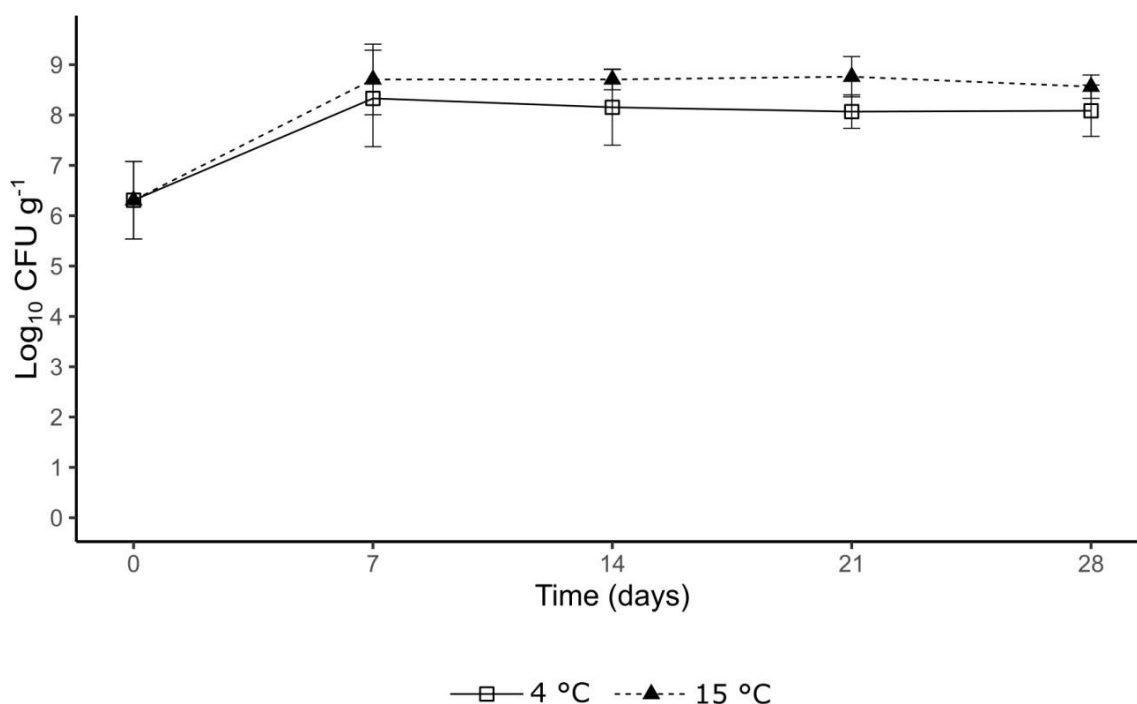
As amostras armazenadas a 4°C também apresentaram características sensoriais indesejáveis ao longo dos dias, como odor desagradável, produção de limo e coloração verde; entretanto, não houve distensão da embalagem, não caracterizando uma deterioração *blown pack*. Tais dados suportam os estudos realizados por Li (2020), que indicam que DBP não ocorre antes de 21 dias de armazenamento a 4°C e, embora, ocorra em temperaturas adequadas de resfriamento, em temperaturas mais elevadas a multiplicação bacteriana acelera o processo de deterioração (MOSCHONAS et al., 2010).

Nesse contexto, destacam-se o grupo de bactérias lácticas, que, frequentemente, constituem a maior parte da comunidade bacteriana relacionada à deterioração em carnes e o grupo de enterobactérias, que também desempenham papel fundamental nesse processo, devido à sua capacidade de metabolizar aminoácidos em compostos voláteis de odor desagradável, por exemplo (BORCH et al., 1996; SAMELLIS et al., 2006). O monitoramento de mesófilos também é importante, visto que atuam como indicadores de qualidade em alimentos, principalmente, produtos de origem animal (GOULART et al., 2020).

5.2. Análises de mesófilos

As médias de contagens de mesófilos nas amostras de acém bovino embaladas a vácuo estão representadas na **Figura 1**.

Figura 1: Contagem média de mesófilos em amostras de acém bovino embalado a vácuo armazenadas a 4°C e 15°C, ao longo de 28 dias. As barras de erro representam o desvio padrão.



* Foi observada diferença significativa nas médias de contagens bacterianas tanto para tempo quanto para temperatura ($p < 0,05$). A temperatura mais baixa de armazenamento (4°C) resultou em menores contagens de mesófilos que a temperatura mais elevada (15°C). Em relação ao tempo, foi observado uma diferença significativa apenas no tempo 0 ($p < 0,05$), ou seja, nos primeiros 7 dias observa-se um aumento substancial das contagens, entretanto, a partir desse ponto ocorre certa estabilização, não apresentando diferença significativa do dia 7 ao 28 ($p > 0,05$).

As contagens apresentaram valores mais elevados para amostras armazenadas a 15°C, com diferença significativa entre as temperaturas ($p = 0.00095$) (**Tabela 2 e Tabela 3**), indicando que a variável temperatura é fator determinante na multiplicação bacteriana. No início do armazenamento, já se observa uma alta contagem. Tal dado indica que as amostras possuem elevada

contaminação inicial, sugerindo que boas práticas de fabricação podem não ter sido bem empregadas.

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para comparação de médias de contagens bacterianas (mesófilos, enterobactérias e bactérias lácticas), a 5% de probabilidade, avaliando diferença significativa para tempo e temperatura. Foi considerado um nível de 5% de significância, ou seja, valores de $p < 0,05$ indicam que houve diferença significativa.

Espécie	Tempo (valor de p)	Temperatura (valor de p)	Tempo X Temperatura (valor de p)
Mesófilos	0.00000	0.00095	0.46379
Enterobactérias	0.000000	0.000342	0.083196
Bactérias lácticas	0.000000	0.000034	0.251828

* Foi observada diferença significativa nas médias de contagens bacterianas tanto para tempo quanto para temperatura ($p < 0,05$), de todos os micro-organismos avaliados (enterobactérias, bactérias lácticas e mesófilos). Analisando-se os efeitos simples, a interação entre as variáveis tempo e temperatura não foi significativa ($p > 0,05$).

De acordo com estudos realizados por Borch (1996), as contagens iniciais de mesófilos em carcaça são de 10^2 a 10^3 UFC/g, em condições higiênicas adequadas de manipulação durante abate. Sheridan (1989) também revelou que a contagem de 10^3 UFC/g pode ser considerada como indicativa de higiene e eficiente operação comercial. Já uma pesquisa desenvolvida por Silva (2015) relatou que a contagem de mesófilos em contra-filé bovino embalado a vácuo era de 10^5 UFC/g no dia zero e, após 15 dias de armazenamento, tanto a 4°C quanto a 10°C , aumentou para 10^7 UFC/g, o que revelou um déficit sanitário no processo de produção da carne. Esses dados corroboram com o fato de que as amostras analisadas nesse estudo possuíam uma alta carga microbiana, visto que as amostras referências já apresentaram uma contagem de 10^6 UFC/g.

O início da deterioração da carne é caracterizado por mudanças na coloração da superfície, quando as contagens estão na faixa de 10^6 UFC/g, e é sucedida por odores desagradáveis (10^7 a 10^8 UFC/g). Ou seja, as contaminações iniciais das amostras se apresentaram altas o suficiente para induzir o processo

de deterioração. A partir do dia 7, tanto as amostras armazenadas a 4°C quanto a 15°C apresentaram contagens médias flutuando em torno de 10⁸ UFC/ g e, sabe-se que as alterações indesejáveis de sabor requerem níveis de 10⁸ a 10⁹ UFC/ g. Além disso, quando atinge o máximo de contagem, por volta de 10⁹ UFC/ g, ocorre a formação de limo superficial; o que, provavelmente, ocorreria se prolongasse o período de armazenamento (ROÇA et al., 1983).

O tempo de armazenamento também influencia diretamente na multiplicação bacteriana. Ao longo dos dias, as contagens vão aumentando e observa-se que as amostras armazenadas a 4°C atingiram seu pico no dia 7 (10⁸.UFC/ g). Isso ocorre, porque durante o processo de resfriamento, pode haver variações no tipo de micro- organismo contaminante. Há predominância inicial de bactérias mesófilas, invertendo-se para psicotróficas durante o armazenamento sob refrigeração. (BARRA et., al 1980).

Tais dados indicam que as variáveis tempo e temperatura possuem influência direta no nível de contaminação das amostras (**Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4**). As análises obtidas também vão de acordo com estudos realizados anteriormente, os quais mostram que a deterioração ocorre, geralmente, quando a contagem bacteriana atinge aproximadamente 10⁸ UFC/cm² (HUIS IN'T VELD et al., 1996; GILL et al., 2000; JONES et al., 2004; NYCHAS et al., 2007).

Tabela 3: Teste de Tukey avaliando as diferentes temperaturas.

Espécie	Temperatura	Grupos
Enterobactérias	4°C	b
	15°C	a
Bactérias lácticas	4°C	b
	15°C	a
Mesófilos	4°C	b
	15°C	a

* É possível perceber que a temperatura de 4°C (b) se difere em relação à de 15°C (a), tanto para as médias de contagens de enterobactérias quanto de bactérias lácticas e mesófilos.

Tabela 4: Teste de Tukey avaliando os diferentes tempos.

Espécie	Tempo	Médias	Grupo
Enterobactérias	0	4.55	b
	7	7.7065	a
	14	7.3665	a
	21	7.766	a
	28	7.529	a
Bactérias láticas	0	5.77	b
	7	7.855	a
	14	7.997	a
	21	8.005	a
	28	8.102	a
Mesófilos	0	6.308	b
	7	8.519	a
	14	8.4315	a
	21	8.4145	a
	28	8.324	a

* É possível perceber que apenas o tempo 0 (b) se difere em relação aos outros tempos, 7, 14, 21 e 28 (a), tanto para as médias de contagens de enterobactérias quanto de bactérias láticas e mesófilos.

Após o 21^o dia, ocorre certa estabilização na contagem de ambas as amostras, visto que os substratos vão se tornando escassos. Além disso, a composição gasosa da atmosfera afeta diretamente a comunidade bacteriana, uma vez que o ambiente gerado pela embalagem a vácuo favorece a multiplicação de bactérias anaeróbicas facultativas (NEWTON et al., 1978; NYCHAS e SKANDAMIS, 2005).

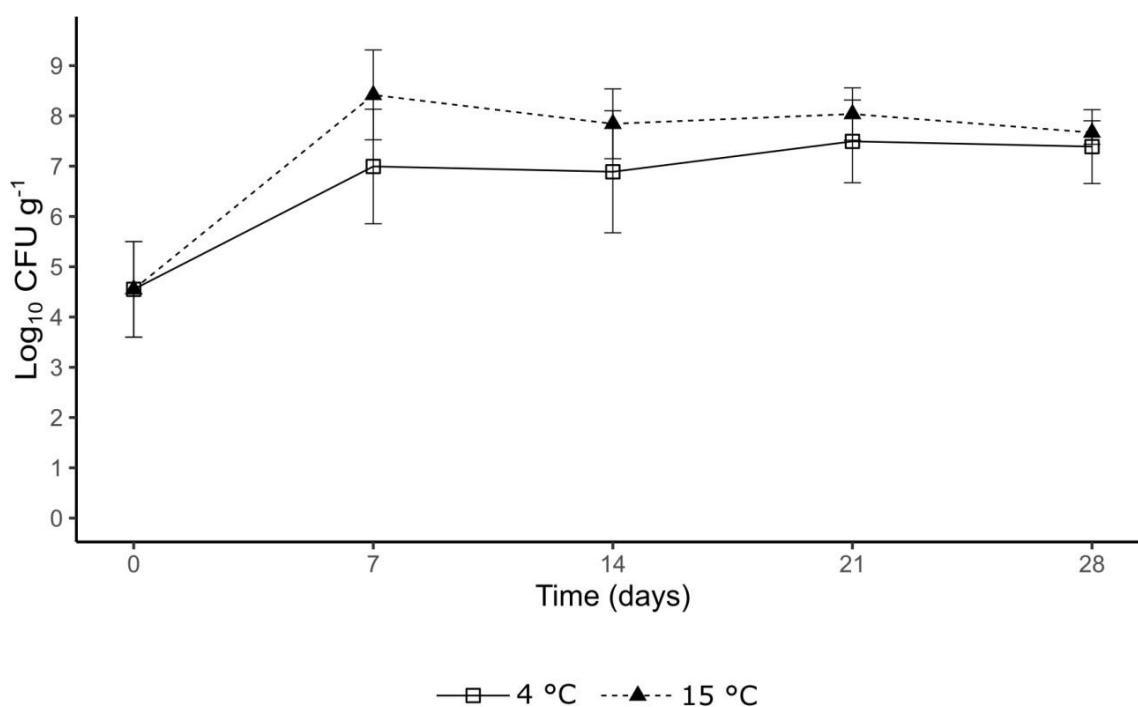
Ao avaliar a vida de prateleira da carne embalada a vácuo, Prado (2005) constatou que carcaças submetidas à aspensão, resfriamento lento e armazenamento a temperaturas mais baixas, entre 0°C a 2°C, obtiveram contagens de mesófilos de 10⁴ UFC/g com 60 dias de estocagem. Resultados semelhantes foram apresentados por Bueno (2005), que analisou amostras de carne bovina embalada a vácuo armazenadas a 0°C, obtendo contagens de mesófilos menores que 10⁶ UFC/g com 120 dias de armazenamento. Ou seja, para garantir produtos com uma maior vida de prateleira, é essencial que a matéria-prima seja de qualidade, pois alimentos com alta contaminação inicial resultarão em produtos

suscetíveis à rápida deterioração. Entretanto, o emprego de métodos adicionais também pode auxiliar a retardar esse processo.

5.3. Análises de enterobactérias

As contagens de enterobactérias também apresentaram valores mais elevados para amostras armazenadas a 15°C (**Figura 2**).

Figura 2: Contagem média de enterobactérias em amostras de acém bovino embalado a vácuo armazenadas a 4°C e 15°C, ao longo de 28 dias. As barras de erro representam o desvio padrão.



* Foi observada diferença significativa nas médias de contagens bacterianas tanto para tempo quanto para temperatura ($p < 0,05$). A temperatura mais baixa de armazenamento (4°C) resultou em menores contagens de enterobactérias que a temperatura mais elevada (15°C). Em relação ao tempo, foi observado uma diferença significativa apenas no tempo 0 ($p < 0,05$), ou seja, nos primeiros 7 dias observa-se um aumento substancial das contagens, entretanto, a partir desse ponto ocorre certa estabilização, não apresentando diferença significativa do dia 7 ao 28 ($p > 0,05$).

Os resultados revelam que no início do armazenamento (tempo 0) as contagens estavam em torno de 10^4 UFC/g. No entanto, após 7 dias de armazenamento foi observada uma diferença significativa nas contagens entre as

amostras armazenadas a 4°C e 15°C ($p = 0.000342$) (**Tabela 2 e Tabela 3**). Apesar do aumento expressivo nas contagens após os 7 primeiros dias, as amostras armazenadas a 4°C apresentaram o pico de contaminação por enterobactérias no 21º dia (**Figura 2**). Wang (2022) reportou resultados similares aos obtidos no presente estudo, onde as contagens de Enterobacteriaceae em carne moída embalada em adsorventes alimentares, armazenada a 4°C, aumentaram significativamente ($p < 0,05$) do dia 0 ao dia 7.

Por outro lado, as amostras armazenadas a 15°C apresentaram o pico na contagem bacteriana no dia 7 (**Figura 2**). Posteriormente, foram observadas oscilações nas contagens ao longo dos dias (variando de 10^7 a 10^8 UFC/ g). Como esperado, as contagens de enterobactérias foram mais elevadas nas amostras armazenadas a 15°C. Esses dados são similares aos obtidos por Rossi (2011), que constatou que a média de contagem de tais micro-organismos em alíquotas de exsudato provenientes de carne bovina embalada a vácuo com deterioração *blown pack* (cedida por frigoríficos, possivelmente, armazenadas em temperaturas mais elevadas) foi significativamente superior à de amostras não deterioradas (obtidas do comércio varejista).

As fontes de contaminação por enterobactérias, geralmente, estão associadas à manipulação e contato com superfícies, ou seja, sua alta contagem pode estar associada a práticas higiênico-sanitárias inadequadas. Uma vez que o produto apresenta elevada contaminação inicial, esses micro-organismos deteriorantes podem multiplicar-se em proporções significativas na carne embalada a vácuo. Esse risco torna-se ainda maior quando a carne é estocada em temperaturas maiores que 10°C (PENNEY et al., 1993).

O fato das amostras armazenadas a 15°C apresentarem o pico de contagem no dia 7 corrobora com a ideia de que o ambiente impõe uma pressão seletiva sobre a comunidade bacteriana. Dessa forma, os grupos mais bem adaptados ao ambiente superam os outros, tornando-se dominantes. Além disso, o desenvolvimento e a sucessão de bactérias deteriorantes podem ser afetados por vários fatores ecofisiológicos, como constituintes da carne, temperatura, pH, atmosfera da embalagem e microbiota concorrente (ROSSI et al., 2011).

Já as amostras armazenadas a 4°C (temperatura de resfriamento considerada adequada) apresentaram um atraso significativo no aumento da

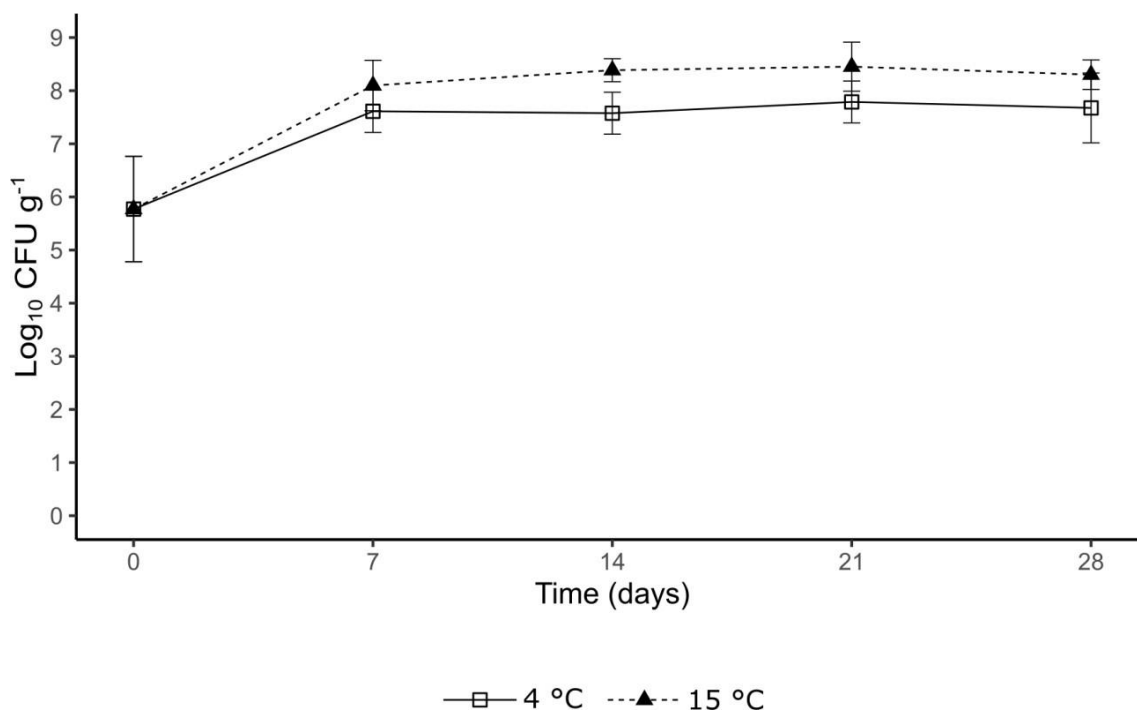
contagem bacteriana, com pico no 21^o dia. O que indica que a menor temperatura de resfriamento possibilita retardar a multiplicação bacteriana, mesmo em produtos com elevada contaminação inicial.

Após realização dos testes de oxidase e fermentação de glicose, cerca de 99,18% dos isolados foram confirmados como enterobactérias (854 isolados dos 861 recuperados). Esse resultado indica que as análises foram realizadas de forma adequada e os dados podem ser avaliados com um alto nível de confiabilidade, visto que a grande maioria das bactérias isoladas foi confirmada como enterobactéria.

5.4. Análises de bactérias lácticas

As contagens de bactérias lácticas (BAL), indicadas na **Figura 3**, revelam uma progressão semelhante às anteriores, ou seja, as amostras armazenadas à temperatura mais elevada (15°C) apresentaram contagens superiores, com diferença significativa ($p = 0.000034$) (**Tabela 2 e Tabela 3**).

Figura 3: Contagem média de bactérias lácticas em amostras de acém bovino embalado a vácuo armazenadas a 4°C e 15°C, ao longo de 28 dias. As barras de erro representam o desvio padrão.



* Foi observada diferença significativa nas médias de contagens bacterianas tanto para tempo quanto para temperatura ($p < 0,05$). A temperatura mais baixa de armazenamento (4°C) resultou em menores contagens de bactérias lácticas que a temperatura mais elevada (15°C). Em relação ao tempo, foi observado uma diferença significativa apenas no tempo 0 ($p < 0,05$), ou seja, nos primeiros 7 dias observa-se um aumento substancial das contagens, entretanto, a partir desse ponto ocorre certa estabilização, não apresentando diferença significativa do dia 7 ao 28 ($p > 0,05$).

Após 7 dias de armazenamento, houve um aumento substancial das contagens nas amostras (armazenadas a 4°C e 15°C), mas a partir desse período, observa-se certa estabilização (**Tabela 4**). Ainda assim, é possível perceber que por volta do 21º dia tem-se a maior contagem — tanto para amostras armazenadas a 4°C (10^7 UFC/ g) quanto a 15°C (10^8 UFC/ g) (**Figura 3**).

De acordo com Jones (2004), após a embalagem a vácuo, a população de BAL, geralmente, é baixa mas aumenta durante o armazenamento. Entretanto, esse aumento se dá até certo ponto, quando ocorre uma estabilização devido à depleção de substrato, o que explica o padrão de contagem observado neste estudo. Além disso, sabe-se que a deterioração em carnes refrigeradas, normalmente, é

detectada quando os micro-organismos deteriorantes estão presentes em níveis de 10^8 a 10^9 UFC/g, sendo que a interação metabiótica entre BAL e enterobactérias intensifica o grau de deterioração do produto (BORCH et al., 1996). No estudo em questão, a contaminação por BAL atingiu tais números ainda no início do armazenamento, quando as amostras foram submetidas a 15°C (**Figura 3**). Isso indica que a matéria prima já possuía uma alta carga bacteriana e as condições inadequadas de armazenamento favoreceram ainda mais sua rápida multiplicação.

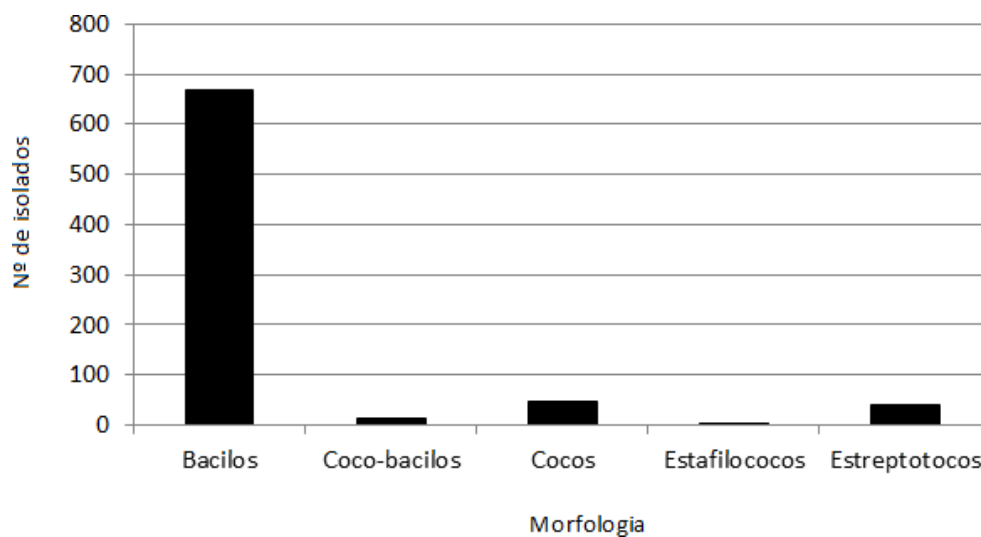
As maiores contagens de BAL ocorreram por volta do 21º dia (**Figura 3**), período em que, geralmente, se iniciava o desenvolvimento de deterioração *blown pack*, sugerindo também a relação desses micro-organismos com tal processo. Contudo, é importante salientar que o desenvolvimento da deterioração não é influenciado apenas pela contagem bacteriana, mas depende também de vários outros fatores, como temperatura de armazenamento e permeabilidade do filme da embalagem ao oxigênio, que vão interferir diretamente na composição bacteriana do produto (TSIGARIDA et al., 2000).

Apesar de boa parte dos gêneros de BAL serem reconhecidos como potenciais produtores de bacteriocinas e outros compostos que inibem o desenvolvimento de patógenos (AYMERICH & HUGAS, 1998), sua população deve ser controlada por meio de medidas higiênico-sanitárias, visto que, dependendo da quantidade em que se encontram e do tipo de embalagem utilizado, podem contribuir para o desenvolvimento de deterioração (HOVE et al., 1999).

Dentre os isolados obtidos, 88,38% foram confirmados como bactérias láticas (776 do total de 878), após realização dos testes de catalase e coloração de Gram. Esses dados indicam a acurácia dos métodos utilizados para isolamento das culturas, garantindo uma alta confiabilidade dos resultados obtidos, visto que a grande maioria dos isolados oriundos do MRS foram confirmados como bactérias láticas.

Do total de isolados confirmados, cerca de 86% apresentaram morfologia de bacilos (**Figura 4**). Nesse contexto, sabe-se que a população de BAL com potencial deteriorante em carnes é representada por gêneros como *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weissella* e *Brochothrix* (METAXOPOULOS et al., 2002; COLLINS et al., 1992; BLICKSTAD, 1983), os quais apresentam morfologia de bacilos, justificando o fato de terem apresentado ampla prevalência no estudo.

Figura 4: Morfologia dos isolados de bactérias lácticas.

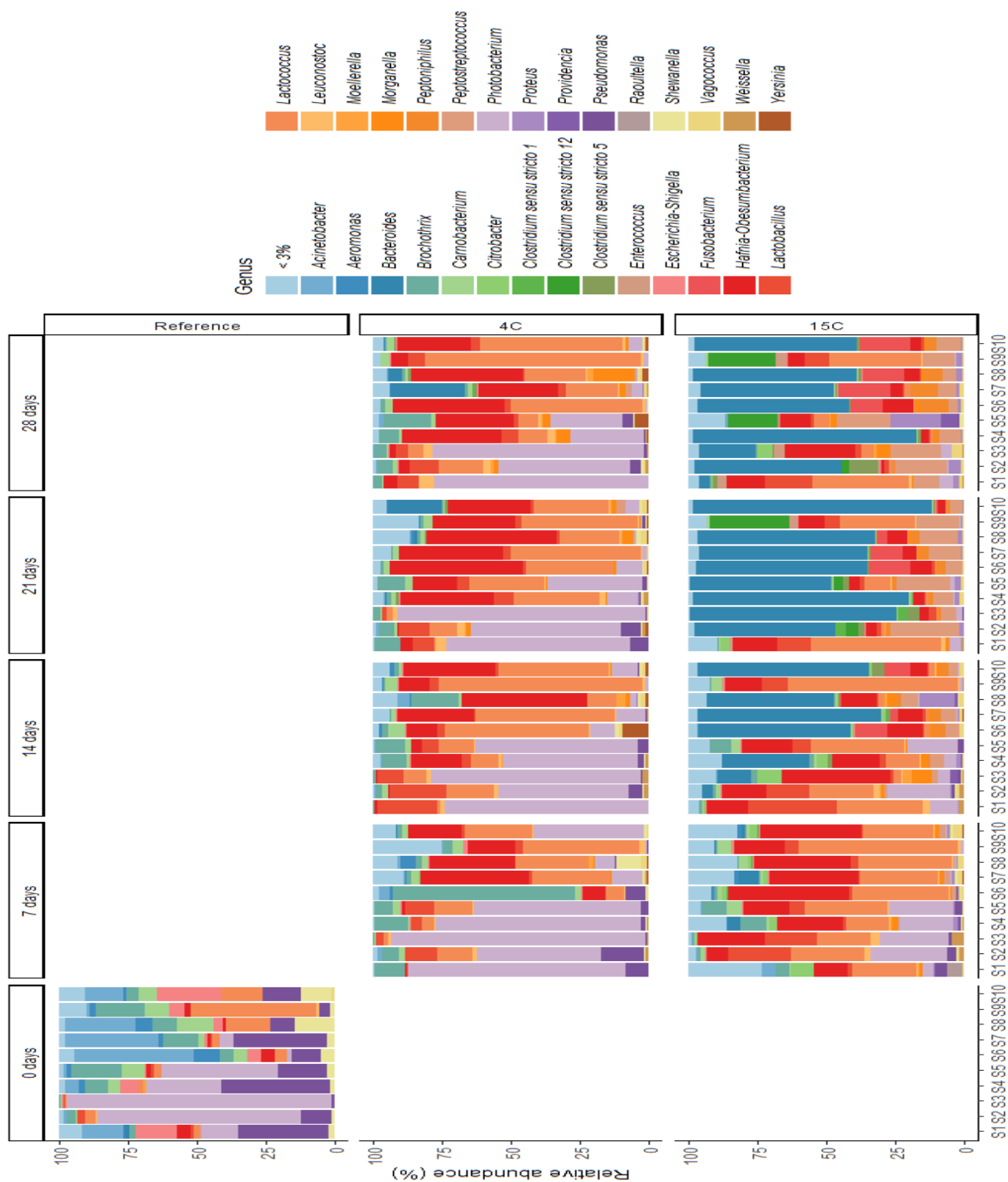


5.5. Caracterização da Comunidade Bacteriana

5.5.1. Composição Bacteriana

A **Figura 5** ilustra a variação da composição bacteriana das amostras de carne bovina embalada a vácuo em diferentes tempos e temperaturas. As amostras referências apresentaram uma prevalência de *Photobacterium*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Também foi possível observar a presença de *Aeromonas*, *Brochotrix* e *Carnobacterium* na maioria dessas amostras, mesmo que em baixo nível de abundância.

Figura 5: Dados da composição microbiana do exsudato de acém bovino embalado a vácuo oriundo de amostras referências, amostras armazenadas a 4°C e 15°C. As análises foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28; sendo que as amostras referências se referem ao dia 0 e foram avaliadas imediatamente após chegar ao laboratório.



Após 7 dias de armazenamento, é possível perceber uma variação da microbiota em, pelo menos, 50% das amostras, principalmente, dos produtos armazenados à temperatura de 15°C. No armazenamento à 4°C, mesmo sendo considerada uma temperatura adequada, também foi possível observar alterações na composição bacteriana. Apesar de apresentar uma grande abundância relativa de *Photobacterium*, ocorre um aumento de *Hafnia-Obesumbacterium* e *Lactococcus* ao longo dos dias; além disso, *Brochotrix* se mostra presente na maioria das amostras, do 7º ao 28º dia. Outro dado importante observado foi a presença de *Yersinia* a partir do 14º dia (**Figura 5**).

Rossi (2011) identificou a presença de *Yersinia* em cortes cárneos embalados a vácuo; enquanto Brenner (1992) apontou esse micro-organismo como um dos gêneros deteriorantes de carne e produtos cárneos. Do ponto de vista de saúde pública, os dados obtidos nesse estudo representam um potencial risco ao consumidor, visto que algumas cepas de *Yersinia* possuem potencial patogênico. Apesar de estar em menores proporções, o gênero foi detectado em produtos cárneos armazenados a 4°C, ou seja, poderiam ter sido ingeridas, normalmente, já no início do armazenamento, sem que fossem notadas alterações sensoriais, podendo, potencialmente, causar problemas à saúde, caso o produto fosse consumido cru ou mal cozido.

As amostras armazenadas a 15°C passaram a apresentar uma prevalência de *Hafnia-Obesumbacterium* e *Lactococcus*. Ao longo dos dias, o perfil microbiano segue sofrendo alterações e, do 14º ao 28º dia, observa-se uma prevalência de *Bacteroides*. A abundância relativa desse grupo apresentou um crescimento contínuo, sendo detectado em 80% das amostras a 15°C no 21º dia — período em que, geralmente, iniciava-se o desenvolvimento de deterioração *blown pack*. Outro dado importante é a presença de espécies de *Clostridium* observada no armazenamento a 15°C, principalmente, nos últimos dias. Além disso, *Enterococcus*, apesar de em baixa abundância relativa, foi relatado nas amostras submetidas à essa temperatura mais elevada, principalmente, do 21º ao 28º dia (**Figura 5**).

Embora o gênero *Lactococcus* esteja, geralmente, associado a processos de fermentação láctea, algumas espécies estão relacionadas à deterioração, como *Lactococcus piscium* e *Lactococcus raffinolactis*, que causam alterações, principalmente, em carne bovina armazenada em embalagens de atmosfera

modificada ou embalagens a vácuo (RAHKILA et al., 2012). Outros estudos também relataram gêneros como *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Lactococcus* e *Serratia* como principais bactérias deteriorantes em produtos cárneos (HOU et al., 2021). Certas espécies do gênero *Enterococcus* (como *Enterococcus viikkiensis* e *Enterococcus hermanniensis*) também já foram relatadas em carne deteriorada, mas em populações mais baixas (KOORT et al., 2004).

Além disso, de acordo com a literatura, *Hafnia* é a espécie mais descrita em carnes durante o armazenamento, sendo também, frequentemente, relatada ao final do armazenamento refrigerado (NYCHAS et al., 1998). Junto com *Serratia liquefaciens* e *Pantoea agglomerans*, destaca-se no desenvolvimento direto da deterioração e de características organolépticas indesejáveis (DAINTY et al., 1989). Estudos conduzidos por Samelis (2006) também corroboram com os dados obtidos, revelando que, dentro da família Enterobacteriaceae, as espécies com maior potencial de deterioração de carne são *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei* e *Enterobacter (Pantoea) agglomerans*.

Apesar de *Bacteroides* serem encontrados em bovinos (RICHARDS et al., 1980; FOGARTY e VOYTEK, 2005), não há muitos estudos sobre sua ocorrência em produtos cárneos. Porém, o potencial deteriorante desse micro-organismo em carnes pode ser significativo e requer mais investigação, visto que sua presença já foi detectada em amostras com deterioração *blown pack* e também no estágio inicial de armazenamento, juntamente com bactérias do filo *Proteobacteria* e *Firmicutes* (MOSCHONAS et al., 2009).

Em relação ao *Clostridium*, sabe-se que é considerado um dos principais agentes relacionados ao processo de deterioração *blown pack* em carnes embaladas a vácuo (DORN-IN et al., 2018; REID et al.). No estudo em questão, foi detectada a presença desse micro-organismo nos últimos dias de armazenamento, nas amostras estocadas a 15°C. Tais resultados estão em concordância com estudos realizados por Rossi (2011), que indicaram amostras deterioradas com positividade significativamente maior para *Clostridium estertheticum*, do que amostras não deterioradas. Além disso, de acordo com Moschonas (2010), a temperatura mais elevada em que a carne é exposta pode promover maior multiplicação de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*. Em adição, sabe-se que apesar de relevantes, a deterioração causada por esses micro-

organismos foi relatada em maior evidência ao final do armazenamento, o que também corrobora com os resultados indicados anteriormente.

De acordo com a literatura, dentre os gêneros comuns em carne fresca, destacam-se *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bactérias lácticas e diferentes gêneros da família Enterobacteriaceae (BLICKSTAD et al., 1981; BLICKSTAD AND MOLIN, 1983; DAINY AND MACHEY, 1992; DAINY et al., 1983; ERICHSEN AND MOLIN, 1981), o que está em concordância com os achados das amostras referências (**Figura 5**).

Conforme elucidado por Wang (2022), o gênero *Acinetobacter* mostrou-se prevalente em amostras controle e ainda apresentou aumento contínuo na abundância relativa ao longo do tempo de armazenamento. No entanto, esse micro-organismo, geralmente, é considerado um agente menor no processo de deterioração devido à sua incapacidade de produzir lipases extracelulares, sulfeto de hidrogênio e trimetilamina (RAWAT, 2015). Contudo, ainda assim, pode influenciar na multiplicação de outras bactérias deteriorantes, através de moléculas de sinal de detecção *quorum* (ZHU et al., 2018).

Brochothrix thermosphacta foi descrito como um dos principais grupos responsáveis pela deterioração em carne cozida sob diferentes condições ecológicas (DOULGERAKI et al., 2012; NYCHAS et al., 2007) e apresentou aumento na contagem em amostras de carne bovina ao longo do armazenamento. Essas bactérias produzem compostos, incluindo acetona-diacetil e ácidos graxos de cadeia curta, que impactam fortemente no odor sensorial da carne (PIN, GARCIA DE FERNANDO & ORDONEZ, 2002). Dessa forma, sua presença na carne fresca pode representar uma preocupação em termos de deterioração.

Além disso, quando *Brochothrix thermosphacta* se multiplica na superfície da carne, em associação à *Pseudomonas* spp., ocorre um consumo preferencial de glicose e oxigênio. Uma vez que a glicose é esgotada, é utilizado aminoácidos, levando a um aumento na produção de limo, alterações no pH e desenvolvimento de odores desagradáveis (YANG et al., 2018). Apesar de *Pseudomonas* spp. ter sido relatada como bactéria predominante em produtos cárneos armazenados aerobicamente (DOULGERAKI et al., 2012); um estudo recente comprovou a adaptação desse grupo a condições anóxicas (HILGARTH et al., 2019). Outras

pesquisas também relataram *Pseudomonas* como um dos grupos responsáveis por deterioração em carne cozida sob diferentes condições ecológicas (DOULGERAKI et al., 2012 e NYCHAS et al., 2008; LI et al., 2020). Ou seja, a associação de

estudos anteriores e dos dados apresentados, ressalta a importância do monitoramento desse micro-organismo em carne bovina embalada a vácuo.

Dentre BAL, *Carnobacterium* se destaca como um dos principais gêneros associado à deterioração de carne crua refrigerada, podendo se tornar dominante ao longo do armazenamento em disponibilidade reduzida de oxigênio (JONES, 2004; LABADIE, 1999). No entanto, os dados apresentados sugerem que, nas amostras analisadas, outros grupos bacterianos conseguiram se sobressair ao longo dos dias, principalmente, na temperatura de 15°C. Dessa forma, *Carnobacterium*, apesar de amplamente relatado como agente deteriorante em carnes, apresentou uma contínua redução ao longo dos dias, sendo sobreposto por outros grupos.

Já os estudos que relacionam *Aeromonas* à deterioração da carne são bastante limitados em comparação a outras bactérias deteriorantes, como *Pseudomonas* spp., que têm sido amplamente investigadas. O potencial deteriorante desse grupo permanece em grande parte desconhecido e vem sendo mais associado ao desenvolvimento de deterioração em frango resfriado (SHAO et al., 2022). Os resultados apresentados indicam que esse grupo esteve presente no início do armazenamento, em baixa abundância relativa, entretanto, devido às condições impostas, outras bactérias passaram a se multiplicar em detrimento de tal.

Em relação ao *Photobacterium*, sabe-se que são micro-organismos comuns em ecossistemas marinhos e, geralmente, vivem em associação com organismos desses ambientes de hábito comensal e saprofítico (URBANCZYK et al., 2010; SUNAGAWA et al., 2015; MACHADO e GRAM, 2017). É um grupo que está, principalmente, relacionado ao processo de deterioração em pescados, resultando em odores desagradáveis; no entanto, pesquisas recentes revelam que tais micro-organismos ocorrem também em carnes refrigeradas (FUERTES-PEREZ et al., 2019; HAUSCHILD et al., 2021). Provavelmente, essa ocorrência se dá pelo fato das duas matrizes alimentares compartilharem algumas características, como baixa temperatura e alta concentração de sal; apesar da carne apresentar uma concentração salina bem menor se comparada a do mar (RUUSUNEN e

PUOLANNE, 2005). A alta abundância relativa dessa bactéria nas amostras referência sugere um nicho a ser mais explorado, visto que ela permanece sendo amplamente detectada durante todo o período de armazenamento a 4°C e, apesar de estar em baixa abundância relativa, esteve presente nas amostras estocadas a 15°C também. Ou seja, indica um novo grupo que, possivelmente, está associado ao processo de deterioração em carnes e requer estudos mais específicos.

5.5.2. Core Microbiano

O *Core Microbiano* representa os grupos de micro-organismos que estão presentes em, pelo menos, 50% das amostras. No estudo em questão, foi identificada a presença de *Pseudomonas* em quase 100% das amostras referência (**Figura 6a**). Apesar desse micro-organismo ter sido amplamente detectado em produtos frescos; ao longo dos dias, outros grupos bacterianos passaram a predominar, principalmente, quando as amostras foram submetidas a temperaturas elevadas (15°C) (**Figura 6c**). Isso ocorreu devido às condições que foram fornecidas, como o ambiente anaeróbio. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que mostram que *Pseudomonas*, quando comparado a outros gêneros, possui um menor envolvimento no processo de deterioração (METAXOPOULOS et al., 2002; COLLINS et al., 1992; CANFONI et al., 1987; BLICKSTAD, 1983). Além disso, também foi possível observar a presença de *Photobacterium* em mais de 50% das amostras referência (**Figura 6a**), micro-organismo comum em ambientes marinhos (URBANCZYK et al., 2010; SUNAGAWA et al., 2015; MACHADO e GRAM, 2017), mas que também vem sendo relatado em carnes refrigeradas (FUERTES-PEREZ et al., 2019; HAUSCHILD et. al, 2021).

Figura 6a: Representação do Core Microbiano das amostras referências (analisadas imediatamente após chegada do frigorífico) de acém bovino embalado a vácuo.

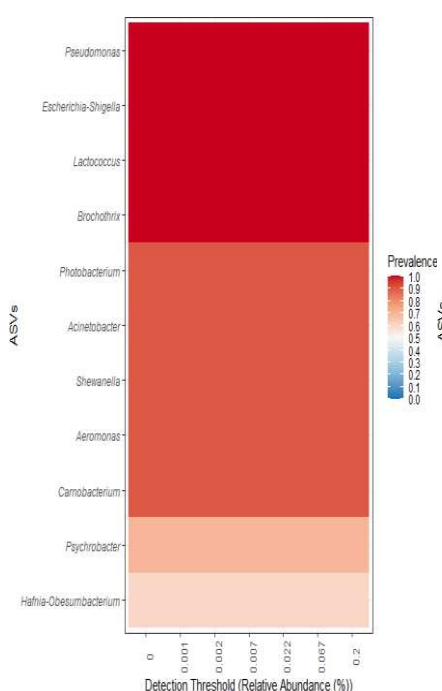


Figura 6b: Representação do Core Microbiano das amostras de acém bovino embalado a vácuo armazenadas a 4°C.

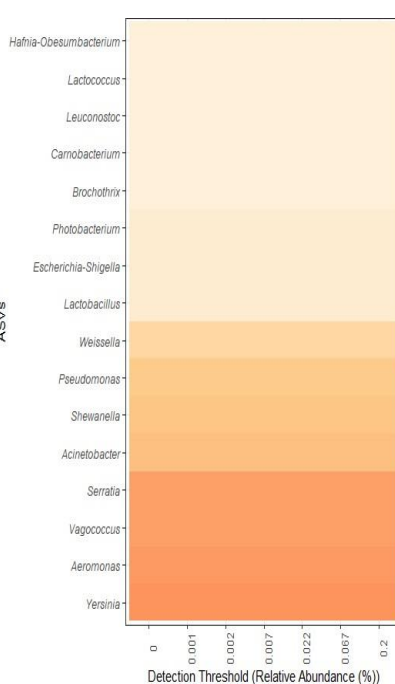
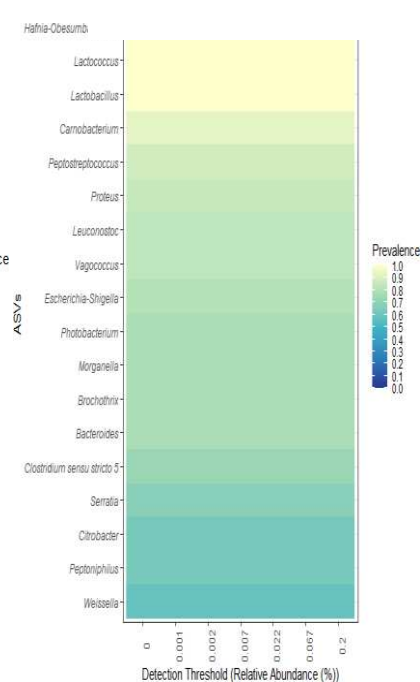


Figura 6c: Representação do Core Microbiano das amostras de acém bovino embalado a vácuo armazenadas a 15°C.



Hafnia-Obesumbacterium já estava presente nas amostras referências, entretanto, em baixa prevelância (Figura 6a). Ao longo do armazenamento, ela passa a prevalecer em quase 100% das amostras, tanto nas que foram armazenadas a 4°C (Figura 6b) quanto a 15°C (Figura 6c). Ou seja, são micro-organismos presentes em pequena quantidade no início do armazenamento, porém, as condições oferecidas pelo ambiente de carne bovina embalada a vácuo foram favoráveis à sua multiplicação, visto que são anaeróbios facultativos, conseguem se multiplicar com 2 a 5% de NaCl, em faixas de temperatura de 4°C a 44°C e em pH de 4,9 até 8,25 (JANDA et al., 2006). Dessa forma, conseguiram se sobrepôr aos outros grupos e contribuir para o desenvolvimento da deterioração. Tais dados vão de acordo com estudos realizados por Nychas (1998), que mostraram que

espécies tolerantes ao frio, comumente, encontradas em carne bovina (como *Hafnia alvei*) se multiplicam em produtos cárneos embalados a vácuo adequadamente resfriados. Além disso, destacam-se no desenvolvimento direto da deterioração e de características sensoriais indesejáveis, como odores desagradáveis (DAINTY et al., 1989).

Foi possível identificar que *Lactococcus* também apresentou-se altamente prevalente do início ao fim do armazenamento, independente da temperatura em que foi estocado (**Figura 6b e 6c**). Ou seja, é um micro-organismo que pode atuar de forma benéfica (devido ao seu potencial probiótico e bacteriocinogênico, por exemplo) mas também possui espécies relacionadas ao processo de deterioração em alimentos (ROSSI et al., 2011), o que requer maior atenção.

Gêneros como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* constituíram o Core Microbiano apenas das amostras armazenadas a 4°C (**Figura 6b**), ou seja, predominaram nos produtos estocados em temperatura de resfriamento adequada. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores, que indicaram esses grupos como agentes de menor importância no desenvolvimento da deterioração (RAWAT, 2015; METAXOPOULOS et al., 2002; COLLINS et al., 1992; CANFONI et al., 1987;

BLICKSTAD, 1983). *Shewanella* também esteve presente apenas no Core Microbiano das amostras armazenadas à temperatura inferior (4°C), o que está em concordância com pesquisas realizadas por Franco & Landgraf (2008), que descreveram esse grupo como causador de esverdeamento em carnes vermelhas frescas armazenadas em embalagens a vácuo em temperaturas entre 1°C e 5°C.

Já *Proteus*, *Morganella*, *Bacteroides* e *Clostridium* estiveram presentes apenas nas amostras armazenadas a 15°C (**Figura 6c**). *Proteus*, frequentemente, contribui para deterioração em carne (GRAM et al., 2002) e *Clostridium* é um dos principais gêneros associado à deterioração *blown pack* em carnes estocadas a temperaturas elevadas (DORN-IN et al., 2018; REID et al., 2017). Entretanto, *Morganella* vem sendo mais relatado em pescados (LIRA, 2019) e, apesar de *Bacteroides* ser encontrado em bovinos, não há muitas pesquisas sobre sua ocorrência no produto final (RICHARDS et al., 1980; FOGARTY e VOYTEK, 2005). Dessa forma, os dados apresentados sugerem que esses grupos podem estar

associados ao processo de deterioração, sendo necessária a realização de mais pesquisas para explorar esse nicho.

5.5.3. Alfa Diversidade

A diversidade alfa refere-se ao número e a abundância de espécies dentro de uma comunidade (MARGURRAN, 1988), ou seja, relaciona-se à forma que a riqueza de micro-organismos está distribuída dentro dos grupos.

Os resultados desse estudo (**Figura 7a e Figura 7b**) permitem inferir que as amostras, tanto armazenadas a 4°C quanto a 15°C, possuem um índice observado próximo ao índice Chao1 (esperado), dessa forma, sabe-se que o sequenciamento foi realizado adequadamente (FRAZILIO et al., 2019).

Figura 7a: Alfa diversidade das amostras armazenadas a 4°C, com análises realizadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Representação do índice observado, Chao1 e Shannon.

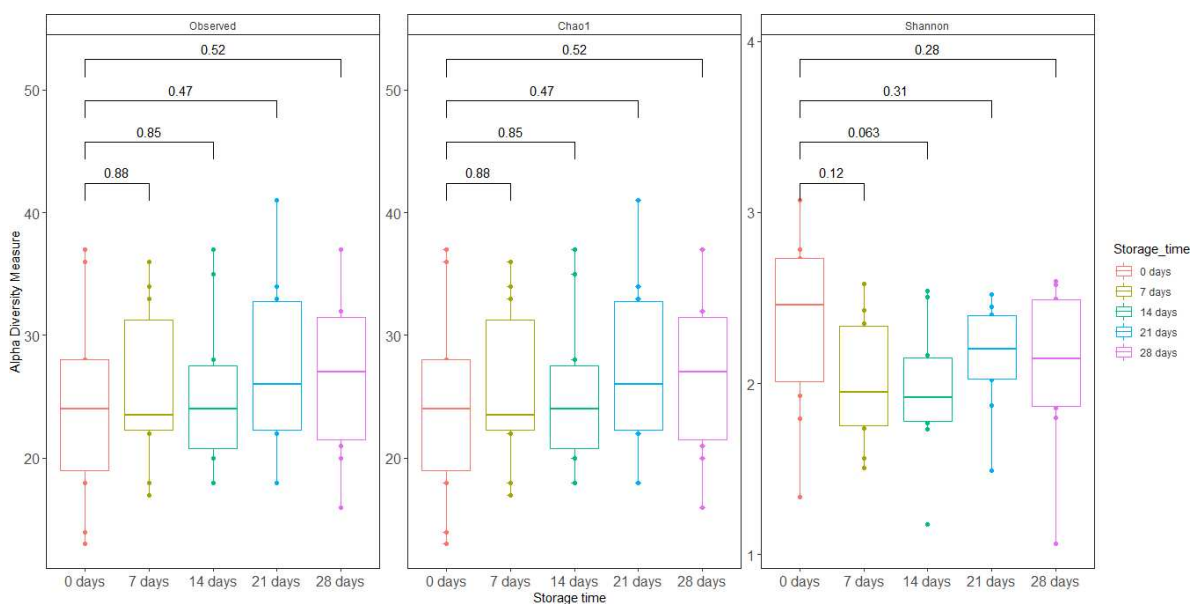
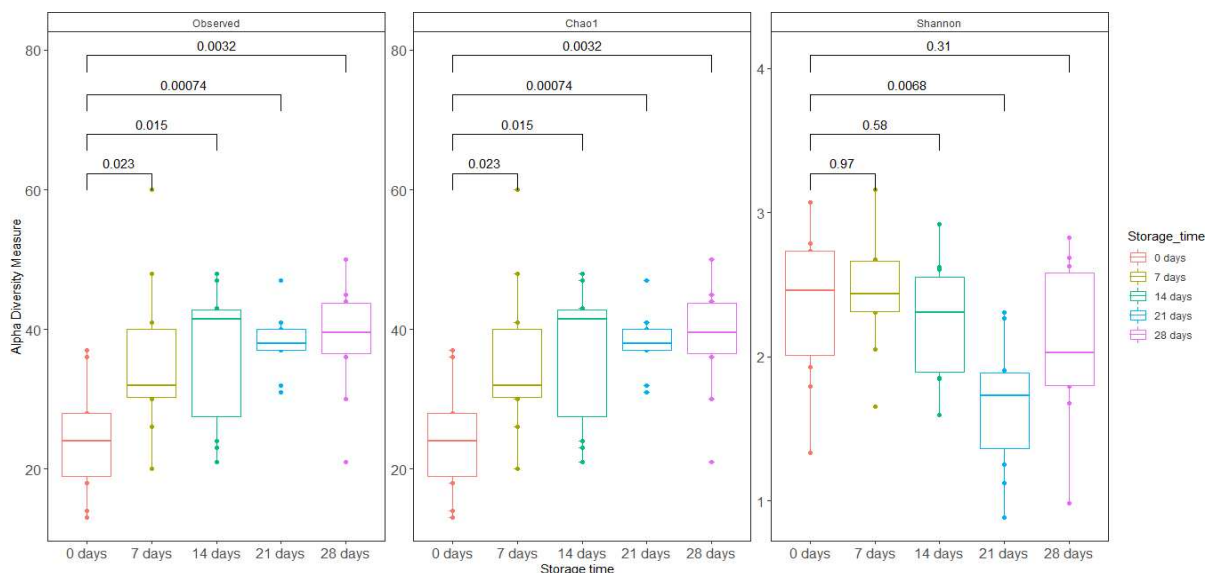


Figura 7b: Alfa diversidade das amostras armazenadas a 15°C, com análises realizadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Representação do índice observado, Chao1 e Shannon.



Além disso, sabe-se que a diversidade alfa é capaz de amostrar a totalidade equitativa. A partir dos gráficos, observa-se que dentro do grupo de amostras armazenadas a 4°C, a temperatura não foi suficiente para alterar a diversidade total, ou seja, não houve um aumento de diversidade significativo ($p > 0,05$) (**Figura 7a**). Em relação a tempo e temperatura, a variável temperatura foi o que mais influenciou a proliferação bacteriana: as amostras armazenadas a 15°C apresentaram um valor de $p < 0,05$, indicando que a diversidade foi significativamente diferente (**Figura 7b**). Esses resultados elucidam a importância do armazenamento adequado e corroboram com estudos que mostram a baixa temperatura como fator mais significativo para retardar a deterioração microbiológica de produtos cárneos embalados a vácuo (MOSCHONA S et al., 2010). Além disso, mesmo amostras com maior taxa de contaminação podem apresentar um atraso significativo no início da deterioração e terem sua vida útil prolongada, se armazenados em temperaturas mais baixas; entretanto, esse é um nicho que necessita de mais pesquisas.

Pode-se observar também que à medida que os dias se passam, a composição bacteriana vai se tornando mais homogênea, o que indica que a microbiota deteriorante passa a dominar o ecossistema e se sobressair em relação aos outros micro-organismos.

6. CONCLUSÕES

Apenas as amostras armazenadas a 15°C apresentaram desenvolvimento de deterioração *blown pack* e a contagem de enterobactérias, bactérias lácticas e mesófilos apresentou-se mais elevada nessas amostras.

No sequenciamento total realizado nas alíquotas de exsudato cárneo, observou-se a presença de *Photobacterium*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* nas amostras referências (dia 0). Entretanto, com o armazenamento, essa microbiota se alterou. Nas amostras armazenadas a 15°C, foram detectadas, inicialmente, *Hafnia-Obesumbacterium* e *Lactococcus*. e, posteriormente, *Bacteroides*. Além disso, *Clostridium* foi identificado, principalmente, nos últimos dias de armazenamento. Já a estocagem a 4°C manteve, inicialmente, a alta abundância relativa de *Photobacterium* mas foi sucedida por um aumento de *Hafnia-Obesumbacterium* e *Lactococcus*. Nessa temperatura, também foi possível detectar a presença de *Yersinia* ao longo dos dias.

Analisando-se os índices de diversidade alfa, observou-se que a diversidade microbiana foi significativamente diferente apenas no armazenamento à 15°C ($p < 0,05$). Além disso, a composição bacteriana foi se tornando mais homogênea, o que indica que a microbiota deteriorante passou a dominar o ecossistema e se sobressair em relação aos outros micro-organismos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, O. G. G. *et al.* Investigating interspecific quorum sensing influence on cocoa fermentation quality through defined microbial cocktails. **BioRxiv**, [s. l.], 2022. DOI <https://doi.org/10.1101/2022.06.14.496151>.

Disponível em:

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.06.14.496151v2>. Acesso em: 21 jun. 2022.

AUDENAERT, Kris *et al.* Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, [s. l.], 2010. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.006>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002009001014>. Acesso em: 11 abr. 2022.

ALCANTARA, Marcela de *et al.* Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [s. l.], 2012. DOI [dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20120001](https://doi.org/10.5935/1981-2965.20120001).

Disponível em:

<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/15#:~:text=Os%20principais%20microrganismos%20envolvidos%20na,as%20leveduras%20e%20os%20bolos>. Acesso em: 3 jul. 2022.

AXELSSON, Lars. (2004). **Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology**. Third Edition. New York, U.S.A: Seppo Saminen and Atte von Wright, 1998.

AYKIN-DINÇER, Elif *et al.* Effect of packaging method and storage temperature on quality properties of cold-dried beef slices. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], 3 abr. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109171>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820301596>. Acesso em: 6 jun. 2022.

AYMERICH, M. T.; HUGAS, M. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. **Eurocarne**.v.8, n.72, p.39-49, 1998.

BARRA, A.J. **Valores de pH e número de microrganismos psicrotróficos em carne bovina. Niterói: 1980.** 63p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 1980.

BELL, R.G., Moorhead, S.M. and Broda, D.M. (2001) Influence of heat shrink treatments on the onset of clostridial *blown pack* spoilage of vacuum packed chilled meat.. **Food Res Intern** 34, 271–275.

BISANZ, Jordan & Spanogiannopoulos, Peter & Pieper, Lindsey & Bustion, Annamarie & Turnbaugh, Peter. (2018). How to Determine the Role of the Microbiome in Drug Disposition. **Drug Metabolism and Disposition**. 46. dmd.118.083402. 10.1124/dmd.118.083402.

BJORKROTH, Katri & Vandamme, Peter & Korkeala, Hannu. (1998). Identification and Characterization of *Leuconostoc carnosum*, Associated with Production and Spoilage of Vacuum-Packaged, Sliced, Cooked Ham. **Applied and environmental microbiology**. 64. 3313-9. 10.1128/AEM.64.9.3313-3319.1998.

BLICKSTAD, E. *et al.* The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4°C. **E. Blickstad**, [s. l.], 7 fev. 1983. DOI

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01299.x>.

Disponível

em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01299.x>. Acesso em: 8 jun. 2022.

BOEREMA, J.A., Broda, D.M., Penney, N. and Brightwell, G. (2007) Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of *blown pack* spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. **J Food Prot** 70,1434–1439.

BOEREMA, J. A. *et al.* Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], 2003. DOI 10.1046/j.1472-765x.2003.01332.x.

Disponível

em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12753250/>. Acesso em: 14 abr. 2022.

BOLYEN, Evan & Rideout, Jai Ram & Dillon, Matthew & Bokulich, Nicholas & Abnet, Christian & Al-Ghalith, Gabriel & Alexander, Harriet & Alm, Eric & Arumugam, Manimozhiyan & Asnicar, Francesco & Bai, Yang & Bisanz, Jordan & Bittinger, Kyle & Brejnrod, Asker & Brislawn, Colin & Brown, C. Titus & Callahan, Benjamin & Caraballo Rodríguez, Andrés & Chase, John & Caporaso, J.. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**. 37. 1. 10.1038/s41587-019-0209-9.

BORCH, Elisabeth *et al.* Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], 7 nov. 1996. DOI [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01135-](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01135-X)

X.

Disponível

em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059601135X>. Acesso em: 5 abr. 2022.

BRENNER, D. J. Introduction to the Family *Enterobacteriaceae*, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W; SCHLEIFER, K. H. (Ed.). **A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. 2ed. New York: Springer Verlag, 1992. p.2673-95.

BRIGHTWELL, Gale & Clemens, Robyn & Ulrich, Shelley & Boerema, Jackie. (2007). Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packed raw meats. **International journal of food microbiology**. 119. 334-9. 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.024.

BRODA, D.M.; MUSGRAVE, D.R.; BELL, R.G. Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with *blown pack* spoilage of vacuum-packed meats. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n.1, p.107-116, 2000.

BUENO, C. P. **Efeito de dois processos de resfriamento, lento e convencional, associados ou não a aspersão de carcaças sobre a qualidade microbiológica da carne bovina embalada a vácuo**. 2005. **80p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Veterinário, Universidade Federal de Goiás, Goiás.**

BYRNE, Brian & MONAGHAN, A.M. & Lyng, James & Sheridan, James & Bolton, Declan. (2009). A case of “blown pack” meat linked to *Clostridium estertheticum* in Ireland. **Journal of Food Safety**. 29. 629 - 635. 10.1111/j.1745-4565.2009.00182.x.

CALLAHAN, Benjamin & Mcmurdie, Paul & Rosen, Michael & Han, Andrew & Johnson, Amy Jo & Holmes, Susan. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**. 13. 10.1038/nmeth.3869.

CALLAHAN, Z., et al. What causes shelf life deterioration in ground beef?. **Meat Science**, v.112. 2016.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174015002314>. Acesso em: 20 out. 2020.

CARRIZOSA, Elia, et al. Bacterial communities of fresh goat meat packaged in modified atmosphere. **Food Microbiology**, v. 65, n.3. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002016302829>. Acesso em: 29 jan. 2021.

CHENOLL, Empar & Macián, Mcarmen & Elizaquivel, Patricia & Aznar, Rosa. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: Population analysis by rDNA-based methods. **Journal of Applied Microbiology**.. 102. 498-508. 10.1111/j.1365-2672.2006.03081.x.

CHOI, HyeLim & Hwang, Bo & Kim, Bong-Soo & Choi, Sang. (2020). Influence of pathogen contamination on beef microbiota under different storage temperatures. **Food Research International**. 132. 109118. 10.1016/j.foodres.2020.109118.

CHURCH, Ivor J; PARSONS, Anthony L. Modified atmosphere packaging technology: A review. **Journal of Science of Food and Agriculture**, [s. l.], 3 fev. 1995. DOI <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670202>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740670202>. Acesso em: 7 abr. 2022.

CLARRIDGE, J.E., (October 2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. 17 (4): 840–62, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840- 862.2004. PMC 523561. PMID 15489351.

COLLINS, M.D. *et al.* Taxonomic studies on a psychrophilic Clostridium from vacuum-packed beef: Description of Clostridium estertheticum sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], 29 set. 1992. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05423.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/96/2-3/235/537201?login=false>. Acesso em: 3 abr. 2022.

COPPOLA, Mario de Menezes; GIL-TURNES, Carlos. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, [s. l.], 2004. DOI <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000400056>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/NN5SDSsssJj8sWgqHjs4PQQv/?lang=pt#>. Acesso em: 7 jan. 2022.

CURIEL, J.A., *et al.* Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. **Meat Science**, v.88, n.3. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174011000246>. Acesso em 30 jan. 2021.

DAINTY, R. H.; EDWARDS, R. A.; HIBBARD, C. M.; RAMANTANIS, S. V. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packed beef. **Journal of Applied Bacteriology**, v.1, p.117.123, 1986.

DAINTY, Richard H. *et al.* Spoilage of vacuum-packed beef by a clostridium sp. **Science of Food and Agriculture**, [s. l.], 1989. DOI <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490410>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2740490410>. Acesso em: 31 mar. 2022.

DEVASIA, V. L. A. et al. Technological advancements in industrial enzyme research. **Advances in Biological Science Research**, [s. l.], p. 85–102, 2019.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128174975000069>. Acesso em: 08 jun. 2022.

DORN-IN, Samart *et al.* Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigorophilum*, *C. bowmanii* and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars (2018).

International Journal of Food Microbiology, v.286. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160518305543>. Acesso: 20 out. 2020.

DOULGERAKI, Agapi & Ercolini, Danilo & Villani, Francesco & Nychas, George-John. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. **International Journal of Food Microbiology**. 157. 130-41. 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020.

DOULGERAKI, Agapi & Paramithiotis, Spiros & Nychas, George-John. (2011). Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging condition. **International Journal of Food Microbiology**. 145. 77-83.

10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030.

EL SHEIKHA, Aly. (2015). Food Safety Issues in Saudi Arabia. **Nutrition and Food Technology: Open Access**. 1. 1-4. 10.16966/nftoa.103.

ERCOLINI, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food: a review. **Journal of Microbiological Methods**. 56, 297–314.

ERCOLINI, Danilo *et al.* Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. **Food Microbiology**, [s. l.], 27 fev. 2009. DOI: 10.1016/j.fm.2009.09.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913704/>. Acesso em: 27 maio 2022).

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**. 2006 Jul;72(7):4663-71. doi: 10.1128/AEM.00468-06. PMID: 16820458; PMCID: PMC1489361.

ERICHSEN, Inger; MOLIN, Göran. Microbial Flora of Normal and High pH Beef Stored at 4 C in Different Gas Environments. **Journal of Food Protection**, [s. l.], 1981. DOI 10.4315/0362-028X-44.11.866. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30856740/>. Acesso em: 11 jan. 2022.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **USDA.gov - United States Department of Agriculture**. Disponível em: <http://www.usda.gov>. Acesso em: 25 jun. 2022.

FENELON, Ana & Andrade, Patrícia & Raghianti, Fernanda & Carrijo, Kênia & Cossi, Marcus. (2019). Microbiological quality of ground beef sold in supermarkets in central Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. 13. 10.5935/1981-2965.20190035.

FILIPPIS, Francesca & La Stora, Antonietta & Villani, Francesco & Ercolini, Danilo. (2013). Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. **PLoS One** 8: e70222. PLoS one. 8. e70222. 10.1371/journal.pone.0070222.

FOGARTY, L.R. and Voytek, M.A. (2005) Comparison of Bacteroides– Prevotella 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species. **Applied and Environmental Microbiology**. 71, 5999–6007.

FRANCO, Bernadette D. Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. Microbiologia dos Alimentos. In: FRANCO, Bernadette D. Gombossy de; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <https://www.studocu.com/pt-br/document/universidade-de-sao-paulo/microbiologia-de-alimentos/microbiologia-dos-alimentos-bernadete-franco-mariza-landgraf/3703771>. Acesso em: 3 abr. 2022.

FRAQUEZA, M. J., Ferreira M. C., Barreto A.S. Spoilage of light (PSE-like) and dark turkey meat under aerobic or modified atmosphere package: microbial indicators and their relationship with total volatile basic nitrogen. **British Poultry Science** 2008;49:12-20.

FRAZILIO, Diego & de Almeida, Otávio Guilherme & Niño-Arias, Fabian & Martinis, Elaine. (2019). Finding a common core microbiota in two Brazilian dairies through culture and DNA metabarcoding studies. **Journal of Food Science and Technology**. 56. 10.1007/s13197-019-04003-1.

FUERTES-PEREZ, Sandra & Hauschild, Philippa & Hilgarth, Maik & Vogel, Rudi. (2019). Biodiversity of Photobacterium spp. Isolated From Meats. **Frontiers in Microbiology**. 10. 2399. 10.3389/fmicb.2019.02399.

GILL, M. H. Brown C. O. *et al.* The role of microbiological testing in systems for assuring the safety of beef. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], 5 dez. 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00408-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00408-6). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500004086#aep-section-id16>. Acesso em: 14 abr. 2022.

GOMEZ-ALVAREZ, V. Biofilm-Growing Bacteria Involved in the Corrosion of Concrete Wastewater Pipes: Protocols for Comparative Metagenomic Analyses. In: DONELLI, G. (Ed.). **Microbial Biofilms – Methods and Protocols**. 1. ed. Rome, Italy: Springer, 2014. p. 323–340.

GONZALES-BARRON, Ursula & Coelho-Fernandes, Sara & Rodrigues, Gisela & Choupina, A. & Bermúdez, Roberto & Osoro, Koldo & Celaya, Rafael & Rosa García, Rocío & Peric, Tanja & Del Bianco, Silvia & Piasentier, Edi & Chiesa, Francesco & Brugiapaglia, Alberto & Battaglini, Luca & Baratta, Mario & Bodas, Raul & Lorenzo, Jose M. & Cadavez, Vasco. (2020). Microbial deterioration of lamb meat from European local breeds as affected by its intrinsic properties. **Small Ruminant Research**. 195. 106298. 10.1016/j.smallrumres.2020.106298.

GOULART, T.; RODRIGUES NUNES, L.; RITA BASTOS FINGER, I.; SOUZA TALHAFERRO, L.; FERNANDA PINTO DA COSTA, P.; ROSA GONÇALVES, C. Avaliação da Contagem Total de Microrganismos Mesófilos Aeróbios em Carne Moída Comercializada em Supermercados de Itaqui/RS. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 2, 14 fev. 2020.

GRAM, Lone & Ravn, Lars & Rasch, Maria & Bruhn, Jesper & Christensen, Allan & Givskov, Michael. (2002). Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. 78. 79-97. 10.1016/S0168-1605(02)00233-7.

GRIMONT, F. & Grimont, P.A.D. (2006). **The Genus *Enterobacter***. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. 2021. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_9

GRIMONT, F. & Grimont, P.A.D. (2006). **The Genus *Serratia***. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_11

HAN, Jina & Liu, Yunge & Zhu, Lixian & Liang, Rongrong & Dong, Pengcheng & Niu, Lebao & Hopkins, David & Luo, Xin & Zhang, Yimin. (2021). Effects of spraying lactic acid and peroxyacetic acid on the quality and microbial community dynamics of vacuum skin-packaged chilled beef during storage. **Food Research International**. 142. 110205. [10.1016/j.foodres.2021.110205](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110205).

HAUSCHILD, Philippa & Hilgarth, Maik & Vogel, Rudi. (2021). Hydrostatic pressure- and halotolerance of *Photobacterium phosphoreum* and *P. carnosum* isolated from spoiled meat and salmon. **Food Microbiology**. 99. 103679. [10.1016/j.fm.2020.103679](https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103679).

HAYNES, E. et al. The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. **Food Control**, [s. l.], v. 101, p. 134–143, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713519300581>. Acesso em: 08 mar. 2022.

HEIR, Even *et al.* Bacteria in the food production environment. **Food Science and Technology**, [s. l.], 20 set. 2012. DOI 14753324. Disponível em: https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84866562634&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&nlo=&nlr=&nls=&sid=bc941a32e1fbbfdd3818aa2557263d23&sot=aut&sdt=a&sl=17&s=AU-ID%286701309260%29&relpos=33&citeCnt=5&searchTerm=&featureToggles=FEATURE_NEW_DOC_DETAILS_EXPORT:1. Acesso em: 12 jul. 2022.

HERNÁNDEZ-MACEDO, Maria Lucila. Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], 1 mar. 2011. DOI 10.1590/S1517-83822011000100001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24031598/>. Acesso em: 3 maio 2022.

HILGARTH, Maik & Lehner, Elisabeth & Behr, Jürgen & Vogel, Rudi. (2019). Diversity and anaerobic growth of *Pseudomonas* spp. isolated from modified atmosphere packaged minced beef. **Journal of Applied Microbiology**. 127. 10.1111/jam.14249.

HOLLEY, Richard A. *et al.* Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, [s. l.], 15 ago. 2005. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002004001042>. Acesso em: 7 jun. 2022.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9.ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HOU, Wenfu, et al. Characterization of spoilage bacterial communities in chilled duck meat treated by kojic acid. **Food Science and Human Wellness**. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.05.015> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453020301671>. Acesso em: 29 jan. 2021.

HOVE, H.; NORGAARD, H.; MORTENSEN, P. B. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. **European Journal of Clinical Nutrition**, n.53, p.339-350, 1999.

HUGENHOLTZ, P., GOEBEL, B.M., PACE, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology** 180, 4765–4774.

HUIS IN'T VELD, Jos H. J *et al.* Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, [s. l.], p. 1-18, 1 nov. 1996. DOI [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7). Disponível

em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160596011397>.

Acesso em: 6 jul. 2022.

HÚNGARO, Humberto M. *et al.* Blown pack spoilage in vacuum-packaged meat: A review on clostridia as causative agents, sources, detection methods, contributing factors and mitigation strategies. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 52, p. 123-138, 8 jun. 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441530203X>. Acesso em: 11 jul. 2022.

IACUMIN, Lucilla *et al.* A survey of a blown pack spoilage produced by *Clostridium perfringens* in vacuum– packaged wurstel. **Food Microbiology**, v.94. 2021. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002020302434>. Acesso em: 03 mai. 2022.

JANDA, J. Michael *et al.* The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], 2006. DOI 10.1128/CMR.19.1.12-28.2006. Disponível

em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360275/>. Acesso em: 3 jun. 2022.

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiological Reviews**, v.50, p. 484-524, 1986.

JONES, Rhys J. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], p. 273-282, 3 fev. 2004. DOI [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00310-6). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503003106>. Acesso em: 22 jun. 2022.

KALCHAYANAND, N. *et al.* Spoilage of Vacuum-Packaged Refrigerated Beef by Clostridium. **Journal of Food Protection**, [s. l.], 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31003305/>. Acesso em: 3 jan. 2022.

KALCHAYANAND, Norasak & Arthur, Terrance & Bosilevac, Joseph & Schmidt, John & Shackelford, Steven & Brown, Ted & Wheeler, Tommy. (2018). Surface pH of Fresh Beef as a Parameter To Validate Effectiveness of Lactic Acid Treatment against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella. **Journal of Food Protection**. 81. 1126-1133. 10.4315/0362-028X.JFP-17-469.

KALSCHNE, Daneysa & Womer, Rute & Mattana, Ademir & Sarmento, Cleonice & Colla, Luciane & Colla, Eliane. (2015). Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in "sliced vacuum-packed cooked ham". **Brazilian Journal of Microbiology**. 46. 00-00. 10.1590/S1517-838246120130019.

KOORT, Joanna & Coenye, Tom & Vandamme, Peter & Sukura, Antti & Björkroth, Katri. (2004). *Enterococcus hermanni* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54. 1823-7. 10.1099/ijs.0.63112-0.

KORHONEN, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. **International Journal of Dairy Technology**, 55(2), 79–88. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00050.x>.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-0307.2002.00050.x>. Acesso em: 01 jun. 2022.

KROCKEL, Lothar. (2013). **The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. IntechOpen. 2013.

KULSKI, Jerzy K. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *In*: KULSKI, Jerzy K. **Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/49602>. Acesso em: 8 jun. 2022.

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, [s. l.], 1999. DOI 10.1016/s0309-1740(99)00006-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22062579/>. Acesso em: 3 dez. 2021

LAMBERT, A D, Smith, J P and Dodds, K L (1991), Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat – a review, **Food Microbiology**, 8, 267–297.

LI, Ran *et al.* Comparing the quality characteristics and bacterial communities in meatballs with or without blown pack spoilage. **LWT - Food Science and**

Technology, [s. /], 20 ago. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109529>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820305181>. Acesso em: 12 abr. 2022.

LINDBERG, A. M.; LJUNGH, Å. S.; AHRNE, LOFDAHL, S.; MOLIN. G. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurized milk or cream and the presence of toxin encoding genes. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.11.17, 1998.

LIRA, Alessandra Danile de. Caracterização e quantificação de bactérias descarboxiladoras de histidina e sua relação com a presença de histamina no pescado. *In*: DE LIRA, Alessandra Danile. **Caracterização e quantificação de bactérias descarboxiladoras de histidina e sua relação com a presença de histamina no pescado**. 2019. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. /], 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/204850/001110659.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 23 jun. 2022.

LIU, Huan *et al.* Rapid evaluation of quality deterioration and freshness of beef during low temperature storage using three-dimensional fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 287. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814619304510>. Acesso em: 20 out. 2020.

LUNDSTROM, H.-S & Björkroth, Katri. (2011). Lactic acid bacteria associated with pig skin at pre- And post-scalding slaughter stages. *Archiv fur Lebensmittelhygiene. Journal of Food Safety and Food Quality*. 62. 26-31. 10.2376/0003-925X-62-26.

MACHADO, H., Gram, Lone, 2017. Comparative genomics reveals high genomic diversity in the genus *Photobacterium*. **Frontiers in Microbiology**. 8 (1204).
Macleod, R.A., 1965. The question of existence of specific marine

MAGURRAN, A.E. (1988) **Ecological Diversity and Its Measurements**. Princeton University Press, Princeton, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-7358-0>

MAKSIMOVIC, A. Z., et al. Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: A focus on lactic acid bacteria diversity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381730837X>. Acesso em: 24 jan. 2021.

MARTINS, W.F., et al. A mathematical modeling approach to the quantification of lactic acid bacteria in vacuum-packaged samples of cooked meat: Combining the TaqMan-based quantitative PCR method with the plate-count method. **International Journal of Food Microbiology**, v.318. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160519303976>. Acesso em: 27 jan. 2021.

MCMURDIE, Paul & Holmes, Susan. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS one**. 8. e61217. [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217).

MELO, Camila Silveira de *et al.* **TEMPO DE ESTOCAGEM DO CONTRAFILÉ MATURADO DE BOVINOS TERMINADOS A PASTO E EM CONFINAMENTO DE ALTO DESEMPENHO. 2008**. Orientador: Albenones José de Mesquita. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Anima) - Universidade Federal de Goiás, [S. l.], Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Dissertacao2008_Camila_Silveira.pdf. Acesso em: 27 jun. 2022.

MERCIER, Samuel *et al.* Time-Temperature Management Along the Food Cold Chain: A Review of Recent Developments. **Food Science and Food Safety**, [s. l.], 16 jul. 2017. DOI 10.1111/1541-4337.12269. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33371570/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

METAXOPOULOS, J. & Mataragas, Marios & Drosinos, Eleftherios. (2002). Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4°C. **Journal of Applied Microbiology**. 93. 363 - 373. 10.1046/j.1365-2672.2002.01701.x.

MOSCHONAS, G. *et al.* Isolation and sources of 'blown pack' spoilage clostridia in beef abattoirs. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], p. 616-624, 9 jul. 2009. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x>. Acesso em: 9 jul. 2022.

MOSCHONAS, G *et al.* The effect of storage temperature and inoculum level on the time of onset of 'blown pack' spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], 11 fev. 2010. DOI 10.1111/j.1365-2672.2009.04455.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19659695/>. Acesso em: 17 jan. 2022.

MOSTARDINI, F., and L. Piergiovanni. 2002. Argon sí. Argon no. Tecn. Alim. 8:76–77.

MUCHENJE, V. *et al.* Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. **Food Chemistry**, [s. l.], p. 279-289, 15 jan. 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.103> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608006432>. Acesso em: 3 jun. 2022.

NEOPROSPECTA (Florianópolis, SC). Carne in natura e micro-organismos deteriorantes. *In*: NEOPROSPECTA (Florianópolis, SC). **Carne in natura e micro-organismos deteriorantes**. [S. l.], 18 mar. 2019. Disponível em: <https://blog.neopropecta.com/carne-in-natura-microrganismos-deteriorantes/>. Acesso em: 24 abr. 2022.

NEOPROSPECTA (Florianópolis, SC). Sequenciamento de DNA aplicado à indústria de alimentos: é possível?. *In*: NEOPROSPECTA (Florianópolis, SC). **Sequenciamento de DNA aplicado à indústria de alimentos: é possível?**. [S. l.], 2 ago. 2019. Disponível em: <https://blog.neopropecta.com/sequenciamento-dna-aplicado-industria-alimentos/>. Acesso em: 11 jun. 2022.

NEWTON, K.G.; HARRISON, J.C.L.; WAUTERS, A.M. Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. **Journal of Applied Bacteriology**, v.45, p.75-82, 1978.

NICHOLAS, A. Bokulich, Charles W. Bamforth & David A. Mills (2012) A Review of Molecular Methods for Microbial Community Profiling of Beer and Wine, **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 70:3, 150-162, DOI: 10.1094/ASBCJ-2012-0709-01 .

NIGAM, A., KNOERS, N. V. A. M., & RENKEMA, K. Y. (2018). Impact of next generation sequencing on our understanding of CAKUT. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. DOI:10.1016/j.semcd.2018.08.013

NIU, Chengtuo & Xue, Yue & Liu, Chunfeng & Zheng, Feiyun & Wang, Jinjing & Li, Qi. (2019). Identification of gas-forming spoilage bacteria in chili sauce and its control using nisin and salt. **LWT - Food Science and Technology**. 118. 108658. 10.1016/j.lwt.2019.108658.

NYCHAS, G. J. E., & Skandamis, P. N. (2005). **Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP)**. In Sofos, J. N. (ed.) Improving the safety of fresh meat (pp. 461–502). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845691028.2.461>.

NYCHAS, George-John E. *et al.* Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, [s. l.], 10 jun. 2007. DOI 10.1016/j.meatsci.2007.06.020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174007002185>. Acesso em: 10 jul. 2022

OGAWA, Umi & Koyama, Kento & Koseki, Shigenobu. (2021). Rapid detection and enumeration of aerobic mesophiles in raw foods using dielectrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**. 186. 106251. 10.1016/j.mimet.2021.106251.

ORDONEZ, J.A.: **Tecnologia de alimentos. Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005

OYARZABAL, O. A.; KATHARIOU, S. **DNA Methods in Food Safety – Molecular Typing of Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens**. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118278666>. Acesso em: 05 jul. 2022.

OZ, Emel, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from pastırma. **Food Control**, v. 77. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517300634>. Acesso em: 20 jan. 2021.

PALUMBO, Samuel A. Is Refrigeration Enough to Restrain Foodborne Pathogens?. **Journal of Food Protection**, [s. l.], 1986. DOI

10.4315/0362-028X- 49.12.1003. Disponível em:
[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30965458/#:~:text=The%20use%20of%20refrigerati on%20\(5,create%20hazards%20from%20certain%20bacteria](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30965458/#:~:text=The%20use%20of%20refrigerati on%20(5,create%20hazards%20from%20certain%20bacteria). Acesso em: 23 jun. 2022.

PARANHOS, Teddy de Souza. Caracterização de bactérias presentes na carne bovina utilizando o sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA. *In*: PARANHOS, Teddy de Souza. **Caracterização de bactérias presentes na carne bovina utilizando o sequenciamento da região V3/V4 do gene 16S rRNA**. 2019. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2019. Disponível em:
https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199736/TCC%20Teddy_19_07_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 11 jun. 2022.

PENNACCHIA, C. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. **Food Microbiology**, [s. l.], 2011. DOI 10.1016/j.fm.2010.08.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21056779/>. Acesso em: 11 abr. 2022.

PENNEY, N.; HAGYARD, C.J.; BELL, R.G. Extension of shelf life of chilled sliced roast beef by carbon dioxide packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v.28, n.2, p. 181-91, 1993.

PENS, Crístian Jean da Silva *et al.* Avaliação da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em sushis de buffets de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Food Research**, [s. l.], 2020. DOI 10.3895/rebrapa.v11n1.10363. Disponível em:
<https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa/article/view/10363>. Acesso em: 3 jul. 2022.

PÉREZ-DÍAZ, I. M. et al. (2021). Genotypic and phenotypic diversity among *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* isolated from industrial scale cucumber fermentations. **Food Microbiology**. 94. 103652. 10.1016/j.fm.2020.103652.

PIN, Carmen & García de Fernando, Gonzalo & Ordóñez, Juan. (2002). Effect of Modified Atmosphere Composition on the Metabolism of Glucose by *Brochothrix thermosphacta*. **Applied and Environmental Microbiology**. 68. 4441-7. 10.1128/AEM.68.9.4441-4447.2002.

POTHAKOS, Vasileios & Devlieghere, Frank & Villani, Francesco & Björkroth, Katri & Ercolini, Danilo. (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**. 109. 10.1016/j.meatsci.2015.04.014.

PRADO, C.S. **Influência do método de resfriamento de carcaças bovinas nas variações de peso e nas medicas físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do contrafilé (m. *Longissimus dorsi*)**. 2005. 167f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

QUAST, Christian & Pruesse, Elmar & Yilmaz, Pelin & Gerken, Jan & Schweer, Timmy & Yarza, Pablo & Peplies, Jörg & Glöckner, Frank. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**. 41 10.1093/nar/gks1219.

RAGAERT, Peter & Verbeke, Wim & Devlieghere, Frank & Debevere, Johan. (2004). Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. **Food Quality and Preference**. 15. 259-270. 10.1016/S0950-3293(03)00066-1.

RAHKILA, Riitta & Nieminen, Timo & Johansson, Per & Säde, Elina & Björkroth, Katri. (2012). Characterization and evaluation of the spoilage potential of *Lactococcus piscium* isolates from modified atmosphere packaged meat. 156: 50-59. **International Journal of Food Microbiology**. 156. 50-9. [10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.022).

RAWAT, Seema. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. **Asian Journal of Plant Science and Research**, [s. l.], 2015. Disponível em: <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60960043/food-spoilage-microorganisms-and-their-prevention20191020-53292-qxr8t-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1658272059&Signature=DWxAJ14bFwj9ctbsrBXC4hIbLsxxKqErrm0SXlePs8QsleIFGTEfcHuRBLB0HHMAcNJ0VTUE33lynjhb1No4amUHM7AQGJhVf0ApJ3rfulq8vpYiyRdqpo31IfAw43TrQsg5KMLVZs7sp1cU4XI1LB3CBzuDJgrD0BbCgGPK-lrsmeAbuDmf-73Z8vG0IV6WE1p~GNdGpqnprxbZS6QPGjFpjJoFCeG4IKAK-D23CMghwWrKTNwII2swD6hIIT6x51Up4JPOv~WwaccqpwxaxITpBQUpQAoswgs7B68OG8AZzAbPJhIKb34Yyui8A4SY5NCokcE5hcOAKznunfoZfQ&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA>. Acesso em: 29 jun. 2022.

REID, Rachael *et al.* Comparison of hot versus cold boning of beef carcasses on bacterial growth and the risk of blown pack spoilage. **Meat Science**, v. 125. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174016305356>. Acesso em: 19 out. 2020.

REUTER, J.A., SPACEK, D., SNYDER, M.P., High-throughput sequencing Technologies, **Molecular Cell**, 58 (2015) 586–597, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>

RICHARDS, R.B., Depiazzi, L.J., Edwards, J.R. and Wilkinson, F.C. (1980) Isolation and characterization of *Bacteroides nodosus* from foot lesions of cattle in western Australia. **Australian Veterinary Journal**, 56, 517–521.

ROÇA, R.O.; BONASSI, I.A. **Alguns aspectos sobre alterações post-mortem, armazenamento e embalagens de carnes**. In: CEREDA, M.P., SANCHEZ, L., coord. Manual de Armazenamento e Embalagens - Produtos Agropecuários. Piracicaba: Livro Ceres Ltda., 1983. cap.7, p.129-152.

ROÇA, Roberto de Oliveira *et al.* MICROBIOLOGIA DA CARNE. In: ROÇA, Roberto de Oliveira Roça *et al.* **MICROBIOLOGIA DA CARNE**. [S. l.]. Disponível em: <https://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca106.pdf>. Acesso em: 3 jul. 2022.

ROSSI JUNIOR, O. D. *et al.* STUDY OF THE MICROBIOTA INVOLVED IN THE "BLOWN PACK" SPOILAGE OF VACUUM-PACKED BEEF. **ARS Veterinária**, [s. l.], 2011. DOI <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2011v27n2p094-101>. Disponível em: <http://www.arsveterinaria.org.br/ars/article/view/314>. Acesso em: 11 jul. 2022.

RUIZ-CAPILLAS, C. & JIMÉNEZ-COLMENERO, F. (2005) Biogenic Amines in Meat and Meat Products, Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, 44:7-8, 489-599, DOI: 10.1080/10408690490489341

RUIZ-CAPILLAS, Claudia *et al.* Biogenic Amine Formation in Refrigerated Fresh Sausage "Chorizo" keeps in Modified Atmosphere. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], 21 dez. 2011. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00550.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4514.2011.00550.x>. Acesso em: 11 abr. 2022.

SADE, Elina, et al. Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. **Food Microbiology**, v.34, n.2. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002316>. Acesso em: 28 jan. 2021.

SAEKI, E. K.; MATSUMOTO, L. S. **Contagem de mesófilos e psicrotróficos em amostras de leite pasteurizado e UHT**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 65, n. 377, p. 29-35, 2010.

SALAM et al., 2013. **Real-time and sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification**. Talanta., 115 (2013), pp. 761-767, 10.1016/j.talanta.2013.06.034

SAMELIS, J.. **Managing microbial spoilage in the meat industry**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. 2006. 10.1533/9781845691417.2.213.

SAMELIS, John; KAKOURI, Athanasia. Growth Inhibitory and Selective Pressure Effects of Sodium Diacetate on the Spoilage Microbiota of Frankfurters Stored at 4 °C and 12 °C in Vacuum. **Foods**, [s. l.], 1 jan. 2021. DOI 10.3390/foods10010074. Disponível em: 10.3390/foods10010074. Acesso em: 11 abr. 2022.

SANT'ANA, Anderson de Souza *et al.* Comparasion of SimplateR test and Petrifilm with plate count agar method for detection and enumeration of bacteria in ice cream. **Food Science and Technology**, [s. l.], 2002. DOI <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000100011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/8wh9mCSpntcXVYJNMWdFvVL/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 5 jun. 2022.

SHAO, Liangting *et al.* Characterization of the spoilage heterogeneity of *Aeromonas* isolated from chilled chicken meat: in vitro and in situ. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], 1 jun. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113470>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643822004054>. Acesso em: 3 ago. 2022.

SHAW, B.G.; HARDING, Charmaigne D. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. **Journal of Applied Bacteriology**, [s. l.], 1984. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb04693.x>. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1984.tb04693.x>. Acesso em: 13 nov. 2021.

SHERIDAN, J. J.; LYNCH, B.Lynch. The influence of processing and refrigeration on the bacterial numbers on beef and sheep offals. **Meat Science**, [s. l.], 1988. DOI [10.1016/0309-1740\(88\)90055-1](https://doi.org/10.1016/0309-1740(88)90055-1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22055887/>. Acesso em: 16 jan. 2022.

SHETTY, Sudarshan & Lahti, Leo. (2019). Microbiome data science. **Journal of Biosciences**. 44. [10.1007/s12038-019-9930-2](https://doi.org/10.1007/s12038-019-9930-2).

SCHILLINGER, Ulrich *et al.* Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, [s. l.], 1987. DOI [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(87\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0740-0020(87)90002-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0740002087900025>. Acesso em: 3 jul. 2022.

SILVA, Alessandra Regina & Nalin de Paulo, Ezio & Sant'Ana, Anderson & Chaves, Rafael & Massaguer, Pilar. (2011). Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C.*

algidicarnis in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. **International Journal of Food Microbiology**. 148. 156-63. 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.016.

SILVA, JULIANO SIQUEIRA E. **ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS**

DO Longissimus dorsi (contra - filé) EMBALADO À VÁCUO EM DIFERENTES TEMPERATURAS. 2015. Monografia (Especialista em Gestão da Qualidade na Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, [S. l.], 2015. Disponível em: http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/20108/4/FB_GQTA_2014_11.pdf. Acesso em: 11 jun. 2022.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5º. ed. São Paulo, Brasil: Blucher, 2017. 534 p. *E-book*.

SMITH, J. S.; KENNEY, P. B.; KASTNER, C. L.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in vacuum packaged fresh beef. **Journal of Food Protection**, v.56, p.497- 500, 1993. STAMATIOU, A & Skandamis, Panagiotis & Nychas, George-John. (2006). Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. 72. 124-34. 10.1128/AEM.72.1.124-134.2006.

STILES, M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 70, 331–345 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF00395940>

STILES, M. E. *et al.* Enterobacteriaceae associated with meats and meat handling. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], 1981. DOI 10.1128/aem.41.4.867-872.1981.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7195193/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

SUNAGAWA, S., Coelho, L.P., Chaffron, S., Kultima, J.R., Labadie, K., Salazar, G., et al., 2015. **Structure and function of the global ocean microbiome**. *Science* 348 (6237), 1261359.

SUSILUOTO, Tuija & Korkeala, Hannu & Björkroth, Katri. (2003). *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. **International Journal of Food Microbiology**. 80. 89-97. 10.1016/S0168-1605(02)00123-X.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Behavior of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.901-909, 2000.

URBANCZYK, H., Ast, J.C., Dunlap, P.V., 2010. Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. **FEMS (Federation of Europeand Microbiological Societies) Microbiology Reviews**. 35 (2), 324–342.

VALSECHI, Octávio Antônio. Microbiologia dos Alimentos. *In*: VALSECHI, Octávio Antônio. **Microbiologia dos Alimentos**. [S. l.], 2006. Disponível em: <https://livrozilla.com/doc/428278/microbiologia-dos-alimentos---ufscar>. Acesso em: 5 abr. 2022.

VASCONCELOS, Elayne C. de *et al.* Microbial status of the lamb carcass and the meat treated with acetic acid, vacuum packaged and aging for 48 days. **Food Science and Technology**, [s. l.], 22 dez. 2002. DOI <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000300013>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cta/a/HY44DWLVwN97R9fZMFMkD8G/?lang=pt>. Acesso em: 7 jun. 2022.

VIHAVAINEN, Elina & Björkroth, Katri. (2009). Diversity of *Leuconostoc gasicomitatum* associated with meat spoilage. **International Journal of Food Microbiology**. 136. 32-6. 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.010.

WAMBUI J, Stephan R. Relevant Aspects of *Clostridium estertheticum* as a Specific Spoilage Organism of Vacuum-Packed Meat. **Microorganisms**. 2019 May 20;7(5):142. DOI: 10.3390/microorganisms7050142. PMID: 31137543; PMCID: PMC6560419.

WANG, Xin *et al.* Changes in the quality and microbial compositions of ground beef packaged on food absorbent pads incorporated with levulinic acid and sodium dodecyl sulfate. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], 28 jun. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109771>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160522002434>. Acesso em: 8 jul. 2022.

XING, R.-R. et al. Application of next generation sequencing for species identification in meat and poultry products: A DNA metabarcoding approach. **Food Control**, [s. l.], v. 101, p. 173–179, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713519300829>. Acesso em: 08 abr. 2022.

YANG, X., Zhu, L., Zhang, Y., Liang, R., & Luo, X. (2018). Microbial community dynamics analysis by high-throughput sequencing in chilled beef longissimus steaks packaged under modified atmospheres. **Meat Science**, 141, 94–102. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174017313153>. Acesso em: 10 mar. 2022.

ZHU, Xinyu & Kougias, Panagiotis & Treu, Laura & Campanaro, Stefano & Angelidaki, Irini. (2017). Microbial community changes in methanogenic granules during the transition from mesophilic to thermophilic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 101. 10.1007/s00253-016-8028-0.