

## DETERMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS DETERIORANTES EM LINGUIÇA CALABRESA, ANTES E APÓS O COZIMENTO

Eduardo Tavares Gomides<sup>1</sup>

Laryssa Freitas Ribeiro<sup>2</sup>

### RESUMO

Atualmente, os desafios das indústrias que fabricam produtos cárneos vêm se tornando cada vez maiores quando se trata do controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos. A composição da carne por si só já é um meio muito favorável ao crescimento microbiano, uma vez que possui nutrientes, elevada atividade de água e pH próximo do ideal. Além disso, diversos fatores no dia a dia do frigorífico, como o ambiente fechado, a manipulação e o processamento podem ser fontes de contaminação, senão higienizados e realizados de forma correta. Diante da diversidade de microrganismos deteriorantes e patogênicos que podem estar presentes nos alimentos, a indústria de alimentos tem buscado análises mais detalhadas da população microbiana nos produtos, com vista a promover uma ação mais eficiente nos controles do processo. Uma dessas alternativas é a análise por sequenciamento de DNA. Assim, o presente relato de caso teve como objetivo a identificação dos principais microrganismos deterioradores de linguiça calabresa, antes e após o cozimento em um frigorífico de suínos na cidade de Ponte Nova, Minas Gerais. Como resultado, foi observado que os principais fungos encontrados na primeira fase antes da defumação foram *Cryptococcus*, *Candida* e *Trichosporon*, além de bactérias do ácido lático (BAL) e *Pseudomonas* spp.. Ao passo que, nas etapas após cozimento houve um predomínio de BAL, *Pseudomonas* spp., Enterobactérias e *Bacillus* spp. Foi observado ainda que a etapa de cozimento tem sido eficiente para a eliminação da grande parte dos microrganismos, sendo houve um predomínio de *Bacillus*, provavelmente em forma de esporos. Dessa forma, considerando que a população microbiana, antes e após o processamento térmico foi semelhante, evidencia-se uma recontaminação ou cozimento inadequado.

**Palavras-chave:** Controle de Qualidade, Microbiologia, segurança de alimentos, sequenciamento de DNA;

### ABSTRACT

Today, the challenges of industries that manufacture meat products are becoming increasingly greater when it comes to controlling deteriorating and pathogenic microorganisms. The meat composition alone is already a very favorable medium for microbial growth, since it has nutrients, high water activity and pH close to ideal. In addition, several factors in the daily life of the refrigerator, such as the closed environment, handling and processing can be sources of contamination, if not sanitized and performed correctly. In view of the diversity of deteriorating and pathogenic microorganisms that may be present in food, the food industry has sought more detailed analyzes of the microbial population in products, with a view to promoting more efficient action in the process controls.

- 
- 1- Médico Veterinário, formado no Centro Universitário de Viçosa (Univiçosa), na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Pós-graduado em Gestão da Qualidade, Higiene e Tecnologia de Produtos de Origem Animal no Ifope Educacional
  - 2- Professora orientadora, médica veterinária, doutora em Medicina Veterinária pela UNESP Jaboticabal e professora do Centro Universitário Mário Palmério (UNIFUCAMP), Monte Carmelo, Minas Gerais.

One of these alternatives is DNA sequencing analysis. Thus, the present case report aimed to identify the main deteriorating microorganisms of pepperoni sausage, before and after cooking in a pork refrigerator in the city of Ponte Nova, Minas Gerais. As a result, it was observed that the main fungi found in the first stage before smoking were *Cryptococcus*, *Candida* and *Trichosporon*, in addition to lactic acid bacteria (BAL) and *Pseudomonas spp.* .. Whereas, in the stages after cooking there was a predominance of BAL, *Pseudomonas spp.*, Enterobacteria and *Bacillus spp.* It was also observed that the cooking step has been efficient for the elimination of most microorganisms, with a predominance of *Bacillus*, probably in the form of spores. Thus, considering that the microbial population, before and after thermal processing was similar, showing a recontamination or an inadequate cooking.

**Keywords:** Quality Control, Microbiology, food safety, DNA sequencing;

## 1. INTRODUÇÃO

As carnes são alimentos com alto valor nutritivo, elevada atividade de água e com pH favorável ao desenvolvimento microbiano.

Por ser um produto nutritivo, ela pode ser deteriorada com rapidez devido à multiplicação de microrganismos e até ser prejudicial à saúde se contaminada com patógenos (Forsythe, 2013).

Os microrganismos estão intimamente associados à disponibilidade, abundância e à qualidade do alimento para o consumo humano. Os alimentos, de forma geral, são facilmente contaminados com microrganismos da natureza, durante a manipulação e o processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para o crescimento de microrganismos e se esses microrganismos tiverem condições de crescer, podem alterar as características químicas e físicas do alimento, podendo levar a sua deterioração. Além disso, os microrganismos nos alimentos também podem ser responsáveis por intoxicações e infecções transmitidas por alimentos (Pelczar, et al., 1997).

No ambiente de um frigorífico, inúmeros microrganismos podem estar presentes, oriundos de várias fontes de contaminação. Alguns desses microrganismos apresentam-se como indicadores de contaminação de origem fecal, de provável presença de patógenos ou de deterioração potencial do alimento, além de indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento Landgraf (2008).

Atualmente, com a aplicação de métodos qualitativos e quantitativos mais abrangentes, como o sequenciamento de DNA. Em situações reais de produção, tem-se percebido que os problemas não são derivados unicamente de um grupo específico de microrganismos a ser controlado para cada tipo de matriz, mas sim das associações entre eles. Isso pode gerar compostos e metabólitos que favoreçam o crescimento de outros grupos, além da dinâmica de crescimento dessas populações e suas sucessões (Paranhos, 2019)

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a identificação, através do análises de sequenciamento DNA de microrganismos, a causa raiz do processo de deterioração de linguiça calabresa produzida em um frigorífico de suínos da cidade de Ponte Nova, Minas Gerais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Características Gerais da Carne

O principal componente da carne é o músculo. Em geral, ele apresenta cerca de 75% de água, 21 a 22% de proteína, 1 a 2% de gordura, 1% de minerais e menos de 1% de carboidratos (Roça, 2011). A carne é considerada um produto altamente proteico, sendo o conteúdo total de nitrogênio do músculo de aproximadamente 95% de proteína e 5% de pequenos peptídeos, aminoácidos e outros compostos (Andrighetto et al., 2010 apud Varmam & Stherland, 1998; Foegeding et al., 2000).

Por ser um alimento rico em nutrientes, pode ocorrer a multiplicação de microrganismos quando ali presentes. Portanto, é importante saber que algumas características podem interferir na qualidade microbiológica da carne, como a atividade de água, pH, temperatura, as quais estão descritas abaixo.

### **2.1.1. A importância da qualidade da Carne**

A produção de carne tem um papel importante no cenário econômico do Brasil, segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) em 2019 foram produzidos 3,983 milhões de toneladas de carne suína sendo destes exportados 750 mil toneladas e 13,245 milhões de toneladas de carne de aves, sendo destes exportados 4,214 milhões de toneladas.

Segundo (FEIJÓ, 2011) a carne pode ser considerada como um alimento nobre para o homem, pois serve para a produção de energia, para a produção de novos tecidos orgânicos e para a regulação dos processos fisiológicos, respectivamente, a partir das gorduras, proteínas e vitaminas constituintes dos cortes cárneos .

O grande mérito nutricional da carne é a quantidade e a qualidade dos aminoácidos constituintes dos músculos, dos ácidos graxos essenciais e das vitaminas do complexo B presentes, tendo também importância o teor de ferro (FEIJÓ, 2011).

É grande o desafio das indústrias de carnes, em produzir um alimento seguro. Segundo Forsythe, 2013, além de precisar produzir alimentos que sejam seguros ao serem consumidos, a indústria de alimentos ainda deve produzi-los de forma que tenham a qualidade esperada pelo consumidor.

### **2.1.2. Fatores que favorecem o crescimento de microrganismos na carne**

Segundo Franco, Bernadette; Landgraf (2008) a carne é considerada um excelente meio de cultura para os microrganismos, pois apresenta fatores intrínsecos e extrínsecos que favorecem o crescimento microbiano. Sendo alguns destes: alta atividade de água; pH favorável para a maioria dos microrganismos e elevado teor de nutrientes. Além disso, não possui constituintes antimicrobianos. Por isso é importante o controle de todos estes elementos no processo de fabricação de produtos cárneos:

#### **2.1.2.1. Atividade de água**

De modo geral, a atividade de água da carne ( $a_w$ ) fresca é de 0,99 ou mais, o que contribui para o nível favorável ao surgimento de grande variedade de bactérias (Pardi et al., 2001). A maioria dos microrganismos, incluindo as bactérias patogênicas, se desenvolve rapidamente a níveis de  $a_w$  entre 0,99 a 0,98 (Terra; de Freitas; Cichoski, 2007).

#### **2.1.2.2. pH**

Um outro fator que pode contribuir para o crescimento microbiano é o pH da carne, ainda que o crescimento de microrganismos seja possível numa faixa ampla de pH. Apesar que, a maior parte das bactérias tem seu ponto ótimo de crescimento próximo da neutralidade, ou seja, pH= 7,0 (Bandeira, 2004). De acordo com Sarcinelli; Venturini; Silva (2007) um músculo vivo possui o valor do pH de 7,2. Ocorrido o abate, o pH da carne diminui, devido à produção de ácido láctico pelo músculo. Assim, a carne passa a apresentar pH final entre 5,7 e 5,9.

### **2.1.2.3. Temperatura**

A temperatura é um importante fator que regula o crescimento bacteriano. Cada microrganismo possui uma faixa de temperatura que pode potencializar o crescimento, neutralizar, diminuir a níveis que não comprometem a saúde e qualidade dos produtos, ou até mesmo a eliminação total dos microrganismos presentes nos produtos. Apesar do crescimento microbiano ser possível em uma faixa de temperatura de - 8 até + 90° C, a maioria dos patógenos tem temperatura ótima de 35° C (Hoffman Fernando Leite, 2001).

### **2.1.2.4. Composição Atmosférica**

A composição gasosa do ambiente que envolve um alimento pode determinar os tipos de microrganismos que poderão predominar nele. A presença de oxigênio favorecerá a multiplicação de microrganismos aeróbios, enquanto a sua ausência causará a predominância dos anaeróbios, embora haja bastante variação na sensibilidade dos anaeróbios ao oxigênio (Franco, Bernadette; Landgraf, 2008).

## **2.2. Deterioração da carne**

A deterioração dos alimentos é um processo complexo que pode ser resultado de uma sucessão de reações enzimáticas originárias dos microrganismos deterioradores ou da própria matriz alimentar como as enzimas líticas presentes nos tecidos (Landgraf, 1996). As carnes podem apresentar várias alterações quando deterioradas, dentre elas:

### **2.2.1. Limosidade Superficial**

A ocorrência da limosidade superficial está relacionada com a temperatura de armazenamento e com a quantidade de água disponível no produto (Franco, Bernadette; Landgraf, 2008).

### **2.2.2. Alteração de Cor**

Os pigmentos na carne são constituídos, principalmente, por duas proteínas: a hemoglobina, que é o pigmento do sangue, e a mioglobina, que é o pigmento dos músculos. A porção heme do pigmento é importante na determinação da cor da carne. Os pigmentos da carne podem reagir com diversos substratos resultantes em alterações na sua cor (Carvalho, 2010).

O ciclo da cor em carnes frescas é reversível e dinâmico permitindo constante interconversão das três formas do pigmento até que a carne seja processada. Por exemplo, com o cozimento a carne muda de cor para o marrom (de Alcantara et al., 2012).

### 2.2.3. Rancificação

A oxidação lipídica constitui a principal causa da deterioração dos corpos graxos, sendo espontânea e inevitável, com implicações diretas sobre o seu valor comercial e de todos os produtos que a partir deles são formulados (de Lima Júnior et al., 2013 apud Larguerre et al., 2007).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos (Ferrari, 1998).

### 2.3. Microrganismos da carne

De acordo com Forsythe (2013) a carne, por si só, é estéril quando no corpo do animal. Entretanto, pode ser contaminada facilmente durante o abate, na evisceração, na manipulação no processamento e na estocagem inapropriada. A multiplicação de microrganismos na carne pode torná-la deteriorada e inaceitável para consumo ou mesmo causar toxiinfecções alimentares nos consumidores.

No processo de obtenção da carne, os microrganismos podem vir de variadas fontes de contaminação, como o solo, a água, utensílios, dos manipuladores, do trato gastrointestinal dos animais, dentre outros.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Saúde (Anvisa), regulamenta os padrões de alguns microrganismos através Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019 que entrará em vigor a partir de dezembro de 2020, até esta data todos os parâmetros seguem conforme RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Cada categoria de produtos, possui um limite aceitável para estes indicados, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Microrganismos Indicadores e patogênicos pesquisados por categoria de produto e seus limites aceitáveis

CATEGORIAS DE PRODUTOS	MICROORGANISMO PESQUISADO				
	Coliformes a 45°C (UFC/g)	Clostridium sulfito redutor a 46°C (UFC/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	Salmonella spp/25g	Listeria monocytogenes (+/-)
Carne in natura e Miúdo Suínos	Não se aplica	Não se aplica	Não se aplica	<b>Ausência</b>	Não se aplica
Carnes temperadas resfriadas ou congeladas	<b>1x10<sup>4</sup></b>	Não se aplica	Não se aplica	<b>Ausência</b>	Não se aplica
Embutidos frescais refrigerados ou congelados	<b>5x10<sup>3</sup></b>	<b>3x10<sup>3</sup></b>	<b>5x10<sup>3</sup></b>	<b>Ausência</b>	Não se aplica
Produtos cárneos cozidos, embutidos	<b>1x10<sup>3</sup></b>	<b>5x10<sup>2</sup></b>	<b>3x10<sup>3</sup></b>	<b>Ausência</b>	<b>Ausência</b>

<b>Produtos cárneos salgados</b>	Não se aplica	Não se aplica	<b>1x10<sup>3</sup></b>	<b>Ausência</b>	Não se aplica
<b>Bacon</b>	Não se aplica	Não se aplica	<b>3x 10<sup>3</sup></b>	<b>Ausência</b>	<b>Ausência</b>
<b>Carne mecanicamente separada de suíno</b>	Não se aplica	<b>1x10<sup>3</sup></b>	<b>5x10<sup>3</sup></b>	<b>Ausência</b>	Não se aplica

Fonte: (ANVISA, 2001)

### 2.3.1. Microrganismos indicadores

Dada a grande variedade, os frigoríficos costumam adotar, em seus autocontroles, pesquisas para alguns microrganismos que podem ser chamados de indicadores. Segundo Ferreira, et al. (2014) esses microrganismos podem ser utilizados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira ou à segurança, neste último caso, devido à presença de patógenos alimentares. Em geral, microrganismos indicadores são utilizados para avaliar aspectos de qualidade e higiene na produção dos alimentos. Alguns microrganismos indicadores serão descritos abaixo.

#### 2.3.1.1. Coliformes Totais

Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C, por 48 horas. São bacilos Gram-negativos e não formadores de esporos. As bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Klebsiella* spp. fazem parte desse grupo (Ferreira; Lima; Coelho, 2014). De acordo com Franco, Bernadette; Landgraf (2008) além de ser encontrado nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solos. Assim, conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos.

#### 2.3.1.2. Coliformes Fecais ou Coliformes a 45°C

A denominação coliformes fecais foi utilizada durante muitos anos para descrever coliformes que fermentavam a lactose com produção de gás a 44,5°C (Silva; Cavalli; Oliveira, 2006). O Ministério da Saúde através da Resolução - RDC n° 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA adotou a denominação coliformes a 45°C.

A *Escherichia Coli* é o principal microrganismo pertencente a este grupo. A presença destes microrganismos em alimentos é o único indicador válido de contaminação fecal. Segundo Franco, Bernadette; Landgraf (2008) em alimentos frescos de origem animal, sua presença pode indicar manipulação sem cuidados de higiene e/ou armazenamento inadequado. Já em alimentos processados, pode indicar o processamento inadequado ou recontaminação pós processamento.

#### 2.3.1.3. *Enterobacteriaceae*

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* abrangem muitos gêneros, incluindo aqueles que fermentam lactose (p. ex., *E. coli*) e os que não a fermentam (p. ex.,

*Salmonella* spp.). A sua presença, principalmente em carcaças, é um indicador da higiene no seu processo de matança dos animais.

#### **2.3.1.4. Bactérias *Mesófilas Aeróbios***

De acordo com Sarkis et. al (2003) apud Bourgeios et al. (1994) os microrganismos mesófilos são aqueles que apresentam crescimento em temperaturas entre 20-45°C. Estas bactérias são produtoras de gás e provocam estufamento da lata que tende a estourar. O pH do produto tende a se elevar e o odor típico de podre é detectado (LANDGRAF, 1996). A presença elevada destes microrganismos em alimentos segundo Franco, Bernadette; Landgraf (2008) indica que a carne é insalubre e pode indicar abuso em relação ao binômio tempo/temperatura durante armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura.

#### **2.3.2. Microrganismos patogênicos**

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por um agente infeccioso específico ou por toxinas por ele produzidas (BRASIL, 2001)

Os organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos são normalmente divididos em dois grupos: Infecciosos e intoxicantes. O primeiro grupo compreende os microrganismos que se multiplicam no trato intestinal humano, enquanto o segundo é formado por aqueles que produzem toxinas, tanto nos alimentos quanto durante sua passagem pelo trato intestinal. (Forsythe, 2013). Abaixo serão descritos alguns desses microrganismos.

##### **2.3.2.1. *Salmonella* spp.**

A *Salmonella* spp. é uma agente importante, causador de doenças de origem alimentar no mundo todo, com significativa morbidade, mortalidade e perdas econômicas. A salmonelose é considerada uma das doenças de origem alimentar relatadas mundialmente com mais frequência. *Salmonella* spp. é um gênero da família *Enterobacteriaceae* (Forsythe, 2013).

Segundo o Ministério da Saúde, a *Salmonella* spp. é uma bactéria que possui duas espécies causadoras de doenças em humanos: *S. entérica* e *S. bongori*, que podem causar dois tipos de doença, dependendo do sorotipo: salmonelose não tifoide e febre tifoide.

A salmonelose é caracterizada por apresentação aguda com febre, dor abdominal, diarreia, náuseas e por vezes vômito. O aparecimento dos sintomas pode variar de 6 a 72 horas (geralmente 12-36) após a ingestão do alimento contaminado e a doença dura de 2 a 7 dias (FERRASSO, 2015 apud WHO, 2013).

##### **2.3.2.2. *Clostridium botulinum***

O *Clostridium botulinum* é um bacilo Gram positivo, que se desenvolve em meio anaeróbio, produtor de esporos, encontrado com frequência no solo, em legumes, verduras, frutas, sedimentos aquáticos e fezes humanas (Cereser et al., 2008).

De acordo com Forsythe (2013) Existem sete tipos de toxinas produzidas pelo *Clostridium botulinum*: A, B, C, D, E, F e G. Elas são diferenciados, basicamente pela antigenicidade, sendo os tipos A, B, E e F os principais causadores de botulismo humano.

Segundo Franco e Landgraf (2008) existem três formas de botulismo conhecidas: o botulismo clássico, correspondente à intoxicação causada pela ingestão de alimentos contendo

neurotoxinas; o botulismo de lesões, que é uma doença infecciosa causada pela proliferação e consequente liberação de toxinas em lesões infectadas por *C. Botulinum* e o botulismo infantil, que é também uma doença infecciosa causada pela ingestão de esporos. As três formas são clinicamente semelhantes.

### **2.3.2.3. *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* é uma bactéria Gram-positiva que apresenta a conformação de bacilo, com laterais paralelas retas e pontas levemente arredondadas (Souza, 2017).

Segundo Forsythe (2013) existem cinco tipos de *C. Perfringens* (A, B, C, D e E), os quais causam dois tipos bem diferentes de doenças alimentares, devido a produção de uma ou mais toxinas. Desses tipos, somente o A, C e D são importantes em saúde pública.

A sintomatologia por infecções de *C. perfringens* é caracterizada pelo aparecimento de diarreias, dores abdominais e náuseas. Geralmente, não ocorrem vômitos e febres. Usualmente, estes sintomas iniciam-se entre 8 a 20 horas após a ingestão dos alimentos contaminados (Pinto, 1996).

### **2.3.2.4. *Staphylococcus aureus***

O gênero *Staphylococcus* spp. são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados (Santos et al., 2007).

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira (Santos et al., 2007).

As intoxicações humanas são causadas pela ingestão de enterotoxinas produzidas nos alimentos por algumas cepas de *St. aureus*, em geral porque o alimento não foi mantido quente (60° C ou mais) ou frio o suficiente (7,2° C ou menos) (Forsythe, 2013).

O período de incubação, de acordo Franco e Landgraf (2008), varia de 30 minutos até 8 horas, e os principais sintomas são náusea, vômito, câibras abdominais, diarreias e sudorese.

### **2.3.2.5. *Listeria monocytogenes***

A *Listeria* spp. é uma bactéria Gram-positiva que não forma endósporos. É móvel, pois possui flagelos, e multiplica-se entre 0 e 42° C. Portanto, a *L. monocytogenes* pode multiplicar-se vagarosamente sob temperaturas de refrigeração, ao contrário da maioria dos outros patógenos de origem alimentar (Forsythe, 2013).

Além disso, é um microrganismo resistente a diversas condições ambientais e pode se multiplicar em temperaturas baixas, como 3° C. É encontrada em uma variedade de alimentos, tanto crus como processados, nos quais pode sobreviver e multiplicar-se com rapidez durante a estocagem (Forsythe, 2013).

A listeriose caracteriza-se por um quadro de alta severidade (meningite, septicemia, aborto) e natureza não entérica, havendo predileção por indivíduos imunodeprimidos, idosos, neonatos e gestantes (Fai et al., 2011).

## **2.4. Métodos de detecção de microrganismos na carne**

Para Forsythe (2013), a análise microbiológica de alimentos inicialmente era utilizada para testar o produto final, cuja liberação dependia do resultado. Atualmente, a abordagem

mais eficaz de segurança de alimentos tem por objetivo eliminar os patógenos alimentares por meio de uma atuação proativa, considerando desde os ingredientes até o produto final, assim previne-se a entrada dos patógenos no processo produtivo ou reduz à níveis aceitáveis. Com controle microbiano nos locais críticos, o produto final deve sair de acordo com as especificações desejadas.

Atualmente, existem vários testes rápidos para detecção dos mais variados microrganismos. Além disso, existem outros diversos tipos de teste que são validados de acordo com os protocolos oficiais para cada tipo de microrganismo e que auxiliam a indústria para o controle dos agentes deteriorantes ou patógenos dos alimentos. Estes métodos devem ser confiáveis, consistentes e acreditados (MAPA, 2018).

#### **2.4.1. Análises por contagem em placas**

O método convencional de contagem de microrganismos consiste no plaqueamento de alíquotas do alimento homogeneizado e das suas diluições, em meios de cultura sólidos, adequadamente selecionados em função do microrganismo a ser enumerado (Franco, Bernadette; Landgraf, 2008).

Para expressar o resultado, é necessário contar as unidades formadoras de colônias. Em uma placa de Petri, preconiza-se contar placas com até 300 UFC. Os manuais de análises e as legislações específicas para microbiologia de alimentos estipulam limite máximo e mínimo de contagem de cada microrganismo (GUERRA, 2016).

#### **2.4.2. Análises número mais provável (NMP) ou tubos múltiplos**

Na técnica NMP, o produto a ser analisado, após a homogeneização, é submetido a pelo menos três diluições decimais seriadas. De cada uma dessas diluições, alíquotas iguais são transferidas para três ou cinco tubos contendo o meio de cultura escolhido e um tubo coletor de gás invertido (tubo de Durhan) (Franco, Bernadette; Landgraf, 2008).

A técnica de tubos múltiplos é bastante útil para detecção de poucas quantidades de microrganismos. Esta técnica permite detecção de até 0,3NMP/g ou mL de alimentos. Este nível de detecção não é possível quando se utiliza o método de contagem em placas (GUERRA, 2016).

#### **2.4.3. Análises rápidas em placas petrifilm**

As placas Petrifilm consistem de cartões de papel quadriculado, revestido de polietileno, recoberto com nutrientes desidratados e um gel hidrossolúvel a frio, protegido por um filme plástico superior transparente revestido internamente pelo mesmo gel e um corante indicador 2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (Souza et al., 2002), os quais são específicos para cada microrganismo.

As principais vantagens das placas Petrifilm™ em relação aos métodos convencionais é que são simples de utilizar, de tamanho pequeno, com longa vida de prateleira e facilitam a leitura dos resultados (SOUZA, 2013 apud FUNG, 2002).

#### **2.4.4. Bioluminescência de ATP**

A molécula de adenosina trifosfato (ATP) é encontrada em todas as células vivas (eucarióticas e procarióticas). Dessa forma, sua presença indica que existem células vivas.

O ATP bioluminescência tem se configurado como método amplamente utilizado na indústria alimentícia para validar e monitorizar a limpeza ambiental (Oliveira; Viana, 2014).

### **2.4.5. Sequenciamento DNA**

Este modelo de análise ainda é pouco utilizado nas indústrias de alimentos em comparação com os outros métodos e consiste na determinação da sequência de nucleotídeos que constituem os genes.

A inclusão dos dNTPs, pela enzima DNA polimerase, interrompe a síntese proteica na respectiva posição e resulta em uma fita marcada com átomos radioativos, ou, mais recentemente, com uma molécula fluorescente. Por meio de eletroforese, as fitas produzidas são alinhadas pelo comprimento e é determinada a ordem em que cada nucleotídeo ocorre. Atualmente, o sequenciamento é realizado em equipamentos automáticos que realizam a eletroforese em capilares (tubos muito finos), permitindo a precisão, alto rendimento e rapidez no processo (Hepp; Schmitt De Nonohay, 2017 apud Watson et al., 2009).

Sabendo da importância microbiológica dos alimentos e do risco de contaminação do mesmo, por diferentes microrganismos, durante a produção e manipulação, o presente estudo teve como objetivo a identificação dos principais microrganismos relacionados ao processo de deterioração de linguiça calabresa um produto cárneo produzida em um frigorífico de suínos da cidade de Ponte Nova/Minas Gerais.

## **3. RELATO DO CASO**

### **3.1. A Empresa**

O Frigorífico localizado na cidade de Ponte Nova possui selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) e realiza o abate em média de 2.700 suínos por dia produzindo um mix variado de produtos in natura e derivados cárneos.

Atualmente, a planta conta com mais de mil colaboradores diretos e quase 4 mil indiretos, fornecendo os produtos para o mercado nacional e internacional.

### **3.2. O produto**

O produto utilizado no presente relato é uma linguiça calabresa ou linguiça defumada suína que, de acordo com a Norma Interna N° 06/DIPOA/SDA de 10 de dezembro de 2014, é classificado como Produto Submetido a tratamento térmico.

O processo de fabricação consiste no preparo da massa, embutimento, defumação em estufa com temperatura entre 72°C e 74°C por 4 horas, resfriamento e por fim, o produto é embalado a vácuo. Todo processo tem por objetivo a redução da população microbiana a níveis seguros para consumo do produto sem nenhuma preparação (cocção ou cozimento).

### **3.3. A investigação da qualidade microbiológica do produto**

Foi realizada uma rastreabilidade em todo o processo, com coletas desde a matéria prima até o produto final. Em seguida, as análises foram para identificação de fungos e bactérias.

As análises foram realizadas por meio de Diagnóstico Microbiológico Digital (DMD) por uma empresa especializada através da extração de DNA, diretamente dos alimentos e de swabs. O DMD tem como princípio a utilização de marcadores genéticos para a identificação de microrganismos, utilizando como base as novas tecnologias de sequenciamento de DNA em larga escala. Este método possui duas etapas principais: i. A etapa laboratorial que

compreende a purificação e extração do DNA, preparo molecular da amostra e sequenciamento do DNA; e; ii) As etapas computacionais que consistem em análises de bioinformática e a implementação dos dados na plataforma de visualização.

A análise de bactérias por meio do DMD é realizada por sequenciamento de DNA em larga escala das regiões V3-V4 do gene rRNA 16S.

A investigação foi dividida em 2 fases, sendo a primeira realizada análises até o processo de estufa (defumação) e a segunda fase foi realizada nas etapas após a defumação do produto.

### 3.3.1. Primeira fase de análise: até o processo de estufa (defumação)

Nesta fase, as coletas foram realizadas em matérias primas, utensílios e ambientes anteriores a etapa de defumação do produto. Todas as coletas foram realizadas em duplicatas e tiveram os seguintes pontos de coleta, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Pontos de coleta da primeira fase de análise, antes da defumação

<b>Categoria</b>	<b>Ponto de Coleta</b>	<b>Categoria</b>	<b>Ponto de Coleta</b>
<b>Produção</b>	Massa do dia	<b>Matéria Prima</b>	Carne
	Embutido depois da fumaça		Miúdos
	Embutido depois do cozimento		CMS
	Produto Final		Gordura
	Massa do silo	<b>Ingredientes</b>	Mix
	Embutido depois da fumaça		Proteína
	Embutido depois do cozimento	<b>Equipamentos</b>	Misturador
	Produto Final		Triturador
	Tripas naturais		Embutidora
	Tripas de colágeno	<b>Ambiente</b>	Sala de produção
	Mão de manipulador		
	Água da bandeja de tripas		

### 3.3.2. Segunda fase: etapas após a defumação

As coletas, nesta fase, foram realizadas após a etapa de defumação do produto, também em duplicada, com os pontos de coleta descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Pontos de coleta da segunda fase de análise, depois da defumação

<b>Categoria</b>	<b>Ponto de Coleta</b>	<b>Categoria</b>	<b>Ponto de Coleta</b>
<b>Ambiente</b>	Estufas	<b>Equipamentos</b>	Varetas antes do cozimento
	Ralos		Varetas após o cozimento
	Setor de resfriamento		Carrinhos antes do cozimento
	Setor de embalagem		Carrinhos após o cozimento
	Estoque de embalagem		Termoformadoras
	Setor de fracionados		Mesas para embalagem de calabresa
	Entrada da barreira		Caixas azul

<b>Embalagem</b>	Embalagens calabresa	<b>Água</b>	Evd's
	Filme tampa		Água de higienização
	Filme fundo		
<b>Manipulador</b>	Luvas – Setor Embalagem	<b>Água</b>	Água de higienização
	Luvas – Setor Fracionado		

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Primeira: até o processo de estufa (defumação)

Os bolores e leveduras também são responsáveis por doenças alimentares, devido à possibilidade de multiplicação de determinadas espécies, as quais são capazes de produzir toxinas fúngicas, como as micotoxinas, encontradas na superfície dos alimentos, quando condições de conservação e armazenamento não são adequadas (Leão et al., 2015 apud Silva et al., 2004).

Dentre os fungos encontrados nas análises, os principais foram *Cryptococcus*, *Candida* e *Trichosporon*. Os fungos do gênero *Cryptococcus spp.* podem ser encontrados no ambiente, possuem temperatura ótima de crescimento entre 30 e 35° C, e são capazes de assimilar várias fontes de carbono e caracterizam-se por apresentar blastoconídios globosos ou ovalados e reprodução assexuada unibrotante, de colo estreito, os quais possuem uma cápsula de polissacarídeo (Paulo et al., 2008 apud Kon et al., 2008).

Apesar deste gênero estar associado a deterioração de produtos cárneos, não foram encontrados relatos na literatura de que esta produção de lipídios seja de fato a causa da deterioração.

O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (Inez; Svidzinski, 2007). A maioria das espécies do gênero *Candida* é mesófila, com temperatura ótima de multiplicação em temperaturas de 25 a 30° C, mas podem crescer em temperaturas abaixo de 0 °C e até 50 °C.

O *Trichosporon spp* habita o solo, a água, vegetais, mamíferos e pássaros, fazendo parte da flora normal da pele (principalmente na região inguinocrural), unhas e mucosa oral (Pereira et al., 2009). Todas as espécies deste gênero são capazes de assimilar diferentes fontes de carbono, de degradar ureia, hidrolisar gorduras e proteínas. Algumas cepas deste gênero estão relacionadas a casos clínicos como infecções superficiais, atingindo principalmente pacientes imunocomprometidos e por isso são tidos como patógenos oportunistas.

Em se tratando das bactérias, foram encontradas bactérias do ácido láctico (BAL), *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, outras bactérias Gram-negativas e bactérias da ordem *Clostridiales* com um predomínio inicial de *Bacillus* no produto final.

O BAL é o principal grupo bacteriano associado à deterioração de produtos cárneos cozidos. A combinação de condições microaerófilas no produto, a presença de cloreto de sódio e nitrito de sódio e a atividade de água reduzida são favoráveis ao seu crescimento. Defeitos de deterioração nos produtos incluem turbidez do suco livre na embalagem, formação de lodo, produção de gás, e descoloração. As carnes são geralmente cozidas entre 65 e 75°C, temperatura suficiente para destruir a maioria dos microrganismos vegetativos, mas não enterococos termodúricos e formadores de esporos bacterianos. (Sperber, 2009).

Segundo, Sperber, 2009 quando os produtos cozidos são embalados anaerobicamente em filmes impermeáveis, a deterioração é causada pelo crescimento de bactérias do ácido láctico, no entanto, quaisquer bactérias sobreviventes ao cozimento e bactérias contaminantes secundários se multiplicam durante o armazenamento subsequente, podendo causar as deteriorações e diminuição de vida de prateleira.

#### 4.2. Segunda Fase: etapas após a defumação

As análises após a etapa de cozimento apresentaram um predomínio de bactérias do ácido láctico (BAL), *Pseudomonas* spp., Enterobactérias e *Bacillus* spp.

As BAL são invariavelmente o grupo de microrganismos predominantes em carnes embaladas a vácuo e produtos cárneos que possam produzir deterioração por acidificação (Chaves, 2010 apud Shaw et al., 1984). A grande parte das BAL relacionadas à deterioração dos alimentos são encontradas de forma onipresente no solo e nas plantas, na pele e nos epitélios dos animais, nas superfícies abióticas e nas plantas de processamento de alimentos. Assim, frigoríficos e nos ambientes de abate e processamento de carnes, uma contaminação pode acontecer facilmente devido ao contato dos utensílios, das superfícies e das mãos dos manipuladores com trato digestivo dos animais ou com superfícies ou carcaças já contaminadas, ocorrendo contaminação cruzada, visto que a carne é um excelente meio de cultura para propagação biológica ((Franco, Bernadette; Landgraf, 2008).

As espécies de *Pseudomonas* spp. são microrganismos ambientais de ocorrência mundial tanto na água como no solo, às vezes em plantas. *Pseudomonas aeruginosa* também é encontrada na pele, nas membranas mucosas e nas fezes (Quinn et al., 2005).

Os gêneros *Pseudomonas* e *Achromobacter* são os principais responsáveis pelas alterações das carnes refrigeradas e conservadas em condições de aerobiose, tendo como espécie típica a *Pseudomonas fluorescens*. (de Alcantara et al., 2012 apud Pardi et al., 2001).

As *Pseudomonas* spp. utilizam preferencialmente a glicose disponível. Quando a glicose é exaurida, os organismos iniciam o catabolismo do aminoácido. Enquanto os produtos do metabolismo da glicose são inofensivos, aqueles do catabolismo de aminoácidos, tais como amônia, aminas e sulfetos orgânicos, resultam em odores e sabores questionáveis, mesmo quando em pequenas quantidades (de Alcantara et al., 2012 apud Holley & Gill, 2005)

A família *Enterobacteriaceae*, se caracteriza por possuir como representantes bactérias em bastonete gram-negativas, facultativas, móveis e que reduzem  $\text{NO}_2$  a  $\text{NO}_3$ . Vivem no trato gastrointestinal do homem e de animais, mas certas espécies podem ser encontradas vivendo saprotificamente em plantas ou mesmo sendo patógenos em vegetais (Carvalho, 2010).

A fonte de Enterobactérias na carne frequentemente esta associada com a manipulação da carne e superfícies de trabalho (Felipe, 2008). Por isso sua presença é frequentemente usada como indicador para possível contaminação fecal decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento.

Os *Lactobacillus* são microrganismos em bastonetes, gram-positivos, podendo ser móveis ou imóveis. Possuem metabolismo fermentativo, podendo ser homolático (no processo fermentativo tem como produto final ácido láctico) ou heterolático (no processo fermentativo tem como produto final ácido láctico e outros produtos da fermentação) (Carvalho, 2010). Como relatado anteriormente, as BAL são as principais bactérias deteriorantes de linguiças e foram encontradas em várias etapas do processo de produção da calabresa, tanto antes como após o cozimento, evidenciando a dispersão dessas bactérias pelo ambiente de produção.

Quando comparadas as amostras do carrinho e da vareta antes e após o cozimento, pode-se observar que o perfil antes do cozimento é formado, basicamente, por Enterobactérias e BAL e após o cozimento é evidenciado um consórcio de *Pseudomonas*.

Esse mesmo consórcio foi também observado em outras amostras e sugere uma formação de biofilme nesses utensílios e equipamentos.

Os biofilmes podem ser compostos por uma única espécie ou por um consórcio de bactérias e constituem uma forma de resistência das bactérias a intempéries, como ação de sanitizantes e altas temperaturas. Os biofilmes, por protegerem as bactérias, se tornam importantes fontes de contaminação, principalmente quando formados em superfícies ou utensílios que têm contato direto com os produtos.

A presença de biofilmes e a dispersão de bactérias do ácido láctico no ambiente pós cozimento podem estar contribuindo para contaminações cruzadas do produto após o cozimento das linguiças.

Outro resultado que sugere uma contaminação pós cozimento é a presença de *Lactobacillus sakei* nas luvas durante o processamento, sendo necessário uma troca mais periódica das luvas, para minimizar o impacto na produção.

Nas mesas para embalagem foi verificado também a presença de BAL e Enterobactérias, que, caso não estejam bem higienizadas no início do processamento, também podem uma fonte de contaminação pós cozimento.

## 5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível observar na etapa antes do cozimento que o perfil microbiológico foi semelhante para todas as amostras, tanto com a tripa natural ou colágeno como para a massa do dia ou do silo. Foi observado ainda que a etapa de cozimento tem sido eficiente para a eliminação da grande parte dos microrganismos, sendo que após ao cozimento houve um predomínio de *Bacillus*, provavelmente em forma de esporos.

Por fim, as análises evidenciaram que recontaminações aconteciam após a etapa de cozimento.

Diante disso, se faz necessário uma validação do processo de higienização dos equipamento, utensílios e salas de produção de calabresa, a fim de verificar a eficácia do processo e identificar as possíveis formações de biofilme, para que uma ação de higienização mais efetiva possa ser realizada.

Uma outra opção é o uso da nisina na composição do produto, uma vez que o seu uso foi liberado no Brasil para utilização em carnes e produtos cárneos através da RDC N° 272, de 14 de março de 2019, com publicação no DOU dia 18 do mesmo mês.

A nisina tem atividade em várias espécies, incluindo *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* e *Micobacterium*, assim como em células vegetativas e esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. O efeito da nisina se dá pela interação com os fosfolipídios da membrana plasmática, promovendo a formação de poros que ocasionam o efluxo do material intracelular. (Revista Aditivos e Ingredientes, 2016)

## REFERÊNCIAS

ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA, CAETANO DA CONCEIÇÃO, D. R. P. A. Comparação Entre Os Métodos Rápidos Simplate R Tpc- Ci E Petrifilm R Ac E Os Métodos Convencionais De Contagem. v. 22, n. 1, p. 60–64, 2002.

ANDRIGHETTO, C. et al. Características químicas e sensoriais da carne bovina. **Currículo Lattes**, 2010.

ANVISA. Resolução - RDC N° 12, de 02 de Janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, v. 121, p. 11, 2001.

BANDEIRA, M. Qualidade microbiológica da carne bovina. p. 43, 2004.

- CARVALHO, I. T. DE. **Microbiologia dos Alimentos**. [s.l: s.n.].
- CERESER, N. D. et al. Botulismo de origem alimentar. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 1, p. 280–287, 2008.
- CHAVES, R. D. “AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DO POTENCIAL DE ESTUFAMENTO POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E ENTEROBACTÉRIAS EM CORTES BOVINOS EMBALADOS A VÁCUO”. 2010.
- DE ALCANTARA, M. et al. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2012.
- DE LIMA JÚNIOR, D. M. et al. Oxidação lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 1, p. 14–28, 2013.
- DE OLIVEIRA ROÇA, R. Composição Química Da Carne. p. 1, 2011.
- FAI, A. E. C. et al. Salmonella sp e Listeria monocytogenes em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): Fator de risco para a saúde pública. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 657–662, 2011.
- FEIJÓ, G. L. D. Conhecendo a carne que você consome: qualidade da carne bovina. **Embrapa**, p. 1 FOLDER, 2011.
- FELIPE, L. Associação de bactérias da família Enterobacteriaceae e Clostridium estertheticum com a deterioração blown pack em cortes cárneos embalados a vácuo. **Aleph**, 2008.
- FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, v. 11, n. 1, p. 3–14, 1998.
- FERRASSO, M. DE M. Rastreamento de Samonella no fluxograma de abate de suínos. v. 3, n. 2, p. 54–67, 2015.
- FERREIRA, H.; LIMA, H.; COELHO, T. Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal. p. 10, 2014.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. [s.l: s.n.].
- FRANCO, BERNADETTE; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**Atheneu, , 2008.
- GUERRA, A. F. Microbiologia de Alimentos, Métodos de Contagem Microbiana. p. 28, 2016.
- HEPP, D.; SCHMITT DE NONOHAY, J. A importância das técnicas e análises de DNA. **ScientiaTec**, v. 3, n. 2, p. 114–124, 2017.
- HOFFMAN FERNANDO LEITE. Higiene. Factores limitantes à proliferação de microrganismos no alimentos. v. 5, p. 30, 2001.
- INEZ, T.; SVIDZINSKI, E. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. p. 319–327, 2007.
- LANDGRAF, M. Deterioração Microbiana de Alimentos. **Microbiologia dos Alimentos**, p. 93–108, 1996.
- LEÃO, S. C. et al. Qualidade Microbiológica e Parasitológica da Carne Moída Comercializada em Aracaju / SE. 2015.
- MAPA. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. [s.l: s.n.].
- OLIVEIRA, A. C. DE; VIANA, R. E. H. Adenosine triphosphate bioluminescence to evaluate the effectiveness of surface cleaning: an integrative review. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 67, n. 6, p. 987–993, 2014.
- PARANHOS, T. D. E. S. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Caracterização de bactérias presentes na carne bovina utilizando o sequenciamento da região

V3 / V4 do gene 16S rRNA Caracterização de bactérias presentes na carne bovina utilizando o sequenciamento da região V3 / V4. p. 1–77, 2019.

PAULO, J. et al. CRIPTOCOCOSE - UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. p. 32–38, 2008.

PEREIRA, D. N. et al. Disseminated Trichosporon spp infection in preterm newborns : a case report. v. 85, n. 5, p. 459–461, 2009.

PINTO, A. DE F. M. A. **DOENÇAS DE ORIGEM MICROBIANA TRANSMITIDAS PELOS ALIMENTOS**. [s.l: s.n.]. v. 4

QUINN, J. P. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**, 2005.

REVISTA ADITIVOS E INGREDIENTES. Nisina: Um conservante alimentício natural. p. 26–32, 2016.

SANTOS, A. L. DOS et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. DA. Características da Carne Suína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2007.

SARKIS, F.; BARANCELLI, G. V.; GALLO, C. R. Avaliação das condições microbiológicas de carnes de animais silvestres no município de São Paulo. **Hig. aliment**, p. 60–67, 2003.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm EC na detecção de coliformes totais E Escherichia coli em alimentos. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352–359, 2006.

SOUZA, L. M. J. DE. Avaliação do sistema petrifilm<sup>tm</sup> na enumeração de microrganismos indicadores da qualidade higiênico- sanitária e patogênicos no leite de origem ovina. Loiane. 2013.

SOUZA, L. T. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS : UMA REVISÃO. 2017.

SPERBER, W. **Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages**. [s.l: s.n.].

TERRA, N. N.; DE FREITAS, R. J. S.; CICHOSKI, A. J. Atividade de água, pH, umidade e desenvolvimento de Staphylococcus xylosum durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 756–760, 2007.