

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Valéria Américo Salazar

**Identificação e quantificação de fungos em embutidos cárneos fermentados artesanais
através de análises genotípicas: uma revisão bibliográfica**

Florianópolis

2022

Valéria Américo Salazar

**Identificação e quantificação de fungos em embutidos cárneos fermentados artesanais
através de análises genótípicas: uma revisão bibliográfica**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Silvani Verruck.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Salazar, Valéria Américo

Identificação e quantificação de fungos em embutidos cárneos fermentados artesanais através de análises genotípicas: uma revisão bibliográfica / Valéria Américo Salazar ; orientadora, Silvani Verruck, 2022.

67 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Metatoxonômica. 3. Embutidos cárneos fermentados artesanais. 4. Fungos. I. Verruck, Silvani . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Valéria Américo Salazar

**Identificação e quantificação de fungos em embutidos cárneos fermentados artesanais
através de análises genotípicas: uma revisão bibliográfica**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos” e aprovado em sua forma final pelo Curso Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Florianópolis, 07 de março de 2022.

Prof^a. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Silvani Verruck
Orientador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Katia Rezzadori
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Carlise Beddin Fritzen Freire
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Carlos e Janete, que sempre me incentivaram e me ensinaram que o bem mais precioso que podemos adquirir ao longo da vida é o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelo Seu cuidado para comigo, em todos os momentos da minha história.

Agradeço aos meus pais, Luiz Carlos e Janete, por apoiarem as minhas escolhas e me concederem todo o suporte necessário para que eu finalizasse essa graduação.

Agradeço ao meu irmão Vinícius por todas as conversas e conselhos nos meus momentos de dúvidas.

Agradeço ao meu irmão Luiz Henrique por ter me acolhido desde o início da minha jornada em Florianópolis e por todas as experiências compartilhadas. E também a Martina, minha sobrinha, que tornou mais leve os momentos difíceis da graduação através da sua alegria e docilidade.

Agradeço ao Bruno, meu futuro noivo, por toda a paciência, compreensão e incentivo para que eu realize os meus sonhos.

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida acadêmica e colaboraram não somente com a minha formação técnica, mas também pessoal. Em especial, à Prof.^a Silvani Verruck, minha orientadora, por todo o conhecimento compartilhado ao longo da minha formação e por toda a resiliência, comprometimento, carinho e dedicação durante a escrita deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante este período da minha vida, especialmente aos colegas de curso e aos que conheci através do Grupo de Oração Universitário (GOU).

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino de qualidade que me foi proporcionado e por todas as experiências que vivenciei durante os anos que estive nessa instituição.

“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo do céu.”

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

Alimentos artesanais têm sido amplamente produzidos ao longo dos anos em todos os locais do mundo, e nos últimos anos uma atenção especial vêm sendo dada a essa classe de alimentos, incluindo os embutidos cárneos artesanais. A fermentação de alimentos artesanais se caracteriza pela ausência do uso de culturas *starters*, ou seja, os microrganismos que participam do processo podem ser oriundos da própria matéria prima utilizada, do ambiente que circunda o processo, dos utensílios e dos manipuladores. Geralmente as bactérias têm sido protagonistas nos estudos sobre os processos fermentativos em embutidos cárneos, contudo, estudos recentes estão revelando que os fungos exercem funções tão importantes quanto as bactérias ao longo de todo o processo de fermentação e maturação. Levando em consideração a importância dos fungos para o processo fermentativo, este trabalho visa apresentar uma revisão bibliográfica acerca dos estudos mais recentes em relação a microbiota de embutidos cárneos fermentados oriundos de diversas localidades do mundo, a fim de entender a relação destes microrganismos com as características sensoriais e com a segurança destes alimentos. Além disso, são abordados os principais métodos fenotípicos e genotípicos utilizados para identificação microbiana. A microbiologia clássica é utilizada para a identificação fenotípica de fungos e bactérias em amostras de alimentos, mas são metodologias limitadas quando se trata da identificação de uma grande quantidade de espécies. A genômica surgiu como alternativa para suprir algumas das limitações da microbiologia tradicional, sendo que a abordagem metataxonômica é extremamente importante para a identificação da microbiota de alimentos fermentados. Diversas espécies de bolores e leveduras estão presentes naturalmente em embutidos cárneos fermentados artesanais e podem ser correlacionadas com o desenvolvimento de compostos voláteis responsáveis por grande parte das propriedades organolépticas desejadas nesse tipo de produto. *Debaryomyces hansenii* e *Candida zeylanoides* foram espécies recorrentes na maioria dos estudos analisados neste trabalho, cuja relação com as propriedades organolépticas são bastante relevantes, podendo assim, serem consideradas cepas com potencial para serem utilizadas como *culturas starters*. Em contrapartida, algumas espécies reportadas (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Penicillium nordicum*) apresentam potencial para a produção de micotoxinas e, quando identificadas, servem como indicadores de falta de controle das condições higiênico-sanitárias adotadas durante o processamento. Neste sentido, estudos futuros se fazem necessários a fim de entender a totalidade da ecologia de embutidos artesanais, com o intuito de formular culturas *starters* que conservem a individualidade característica de cada região mas que permitam que o processo fermentativo ocorra de forma controlada.

Palavras-chave: embutidos cárneos fermentados, fungos, bolores, leveduras, metataxonômica.

ABSTRACT

Artisanal foods have been widely produced over the years worldwide, and in recent years special attention has been paid to this class of food, including artisanal meat sausages. The fermentation of artisanal foods is characterized by the absence of the use of starter cultures, that is, the microorganisms that participate in the process may come from the raw material used, the environment that surrounds the process, the utensils, and the manipulators. Bacteria generally have been protagonists in studies on the fermentation processes in meat sausages, however, recent studies are revealing that fungi perform functions as important as bacteria throughout the fermentation and maturation process. Taking into account the importance of fungi for the fermentation process, this work aims to present a literature review over the most recent studies on the mycobiota of fermented meat sausages worldwide, in order to understand the relationship of these microorganisms with sensory characteristics and safety. In addition, the main phenotypic and genotypic methods used for microbial identification are discussed. Classical microbiology is used for the phenotypic identification of fungi and bacteria in food samples, but they are limited methodologies when it comes to the identification of a large number of species. Genomics has emerged as an alternative to overcome some of the limitations of traditional microbiology, and the metataxonomic approach could be important for the identification of the microbiota of fermented foods. Several species of molds and yeasts are naturally present in artisanal fermented meat sausages and can be correlated with the development of volatile compounds responsible for most of the organoleptic properties desired in this type of product. *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* were recurrent species in most of the studies revised in this work, whose relationship with the organoleptic properties are quite relevant, and can thus be considered strains with the potential to be used as starter cultures. On the other hand, some reported species (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Penicillium nordicum*) have the potential for the production of mycotoxins and, when identified, could serve as indicators of lack of control of the hygienic-sanitary conditions adopted during processing. In this sense, future studies are necessary to understand the complete ecology of artisanal sausages, in order to formulate starter cultures that preserve the individuality of each region but that allows the fermentation process to occur in a controlled manner.

Keywords: fermented meat sausages, fungi, molds, yeasts, metataxonomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas de elaboração de embutidos cárneos fermentados.....	25
Figura 2 – Reação química para a formação de nitrosilmioglobina.....	27
Figura 3 – Estrutura do gene 16S rRNA.....	33
Figura 4 – Estrutura que codifica o RNA ribossomal para eucariotos.....	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais meios de cultura utilizados em análises microbiológicas fenotípicas para quantificação de bolores e leveduras em amostras de alimentos.....	31
Quadro 2 – Estudos de aplicação de métodos microbiológicos fenotípicos e genotípicos para identificação de fungos em embutidos cárneos fermentados.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists
ASV's - Sequências únicas
A_w - Atividade de Água
BPF - Boas Práticas de Fabricação
CO₂ - Dióxido de Carbono
DG18 - Ágar Dicloran Glicerol 18
DRBC - Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
HTS - Sequenciamento de Alto Rendimento
ITS - Espaçador Transcrito Interno
MEA - Ágar Extrato de Malte
MLST - Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Loci
NGS - Métodos de Nova Geração
OAV - Valores de Atividade de Odor
OE - Óleo essencial
OTA - Ocratoxina A
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
PDA - AC - Ágar Batata Dextrose Acidificado
PFGE - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
SLST - Tipagem por Sequenciamento de Único Locus
UFC - Unidades Formadoras de Colônias
UR - Umidade Relativa
WGST - Tipagem por Sequenciamento Completo do Genoma
YEGC - Ágar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol
YPD - Ágar Extrato de Levedura Peptona Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos	20
2	METODOLOGIA	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	PRODUTOS CÁRNEOS E SEUS DERIVADOS	22
3.2	EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS ARTESANAIS	23
3.2.1	Etapas do processamento de embutidos cárneos fermentados	24
3.3	MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CLÁSSICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	31
3.4	MÉTODOS GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	33
3.5	IDENTIFICAÇÃO DA MICOBIOTA DE EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS ARTESANAIS UTILIZANDO MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS TRADICIONAIS E GENOTÍPICOS	38
4	CONCLUSÃO	55
5	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Muito se tem discutido acerca da produção de alimentos menos processados e a respeito de dietas vegetarianas e veganas, entretanto, o consumo de produtos derivados de animais, como produtos lácteos e produtos cárneos, ainda é muito comum e bastante representativo na sociedade contemporânea (CASARIL, 2017). Entre os derivados cárneos mais consumidos, encontram-se os embutidos, cuja definição é estabelecida pela legislação brasileira como produtos fabricados a partir de carnes ou órgãos comestíveis, que podem ser curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, envolvido por uma tripa, sendo que esta pode ser de origem natural ou artificial (BRASIL, 2017). A linguiça colonial e as diversas variedades de salames são os principais representantes dos embutidos fermentados e se diferenciam entre si pelas características de produção, especialmente pelo tempo de fermentação e maturação (BACKES, 2011).

A produção de embutidos cárneos fermentados chegou ao Brasil, mais especificamente na região sul, através da influência de imigrantes alemães e italianos e, aos poucos, as indústrias foram crescendo e a produção destes alimentos começou a ser realizada em maior escala (OLIVEIRA, 2020). Com isso, os processos foram sendo padronizados, entretanto, a fabricação de alimentos de forma artesanal segue sendo uma prática comum e, inclusive, vem ganhando força no mercado alimentício (OLIVEIRA, 2019). Em decorrência da crescente demanda por este tipo de produto, o Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019 foi implementado para normatizar a produção artesanal de alimentos de origem animal, uma vez que tais produtos necessitam de um controle microbiológico rigoroso a fim de evitar o desenvolvimento de microrganismos com potencial patogênico, especialmente durante o processo de fermentação.

As bactérias, bolores e leveduras são fundamentais para o processo de fermentação de embutidos cárneos, pois estes microrganismos são os responsáveis pelas transformações bioquímicas que dão forma ao produto final (CASABURI et al. 2007). As bactérias são amplamente utilizadas como culturas *starters* e os fungos, tanto aqueles de ocorrência natural quanto os constituintes das culturas *starters*, são responsáveis por grande parte das características físico-químicas e dos atributos sensoriais desejáveis em embutidos cárneos fermentados, como o sabor e aroma característicos. Em contrapartida, há algumas espécies de fungos que apresentam potencial deteriorante e outras capazes de produzir micotoxinas - metabólitos tóxicos ao organismo humano - em determinadas condições (SILVA et al, 2017;

PERRONE *et. al*, 2019). Sendo assim, devido a potencial ocorrência dessas espécies, a identificação e quantificação dos microrganismos se torna extremamente importante para a prevenção, ou até mesmo, eliminação daqueles produtores de micotoxinas.

O principal fator que diferencia os embutidos cárneos fermentados artesanais do restante dos embutidos disponíveis no mercado é a forma de preparo e a microbiota que participa do processo fermentativo. Os alimentos artesanais são predominantemente preparados com matérias-primas de produção própria de origem determinada, cuja elaboração é realizada dando preferência às técnicas manuais (BRASIL, 2019) e a fermentação ocorre de forma natural, sem a adição de microrganismos iniciadores (PEREIRA; BARCELLOS; BERSOT, 2019). Contudo, os métodos de análises microbiológicas são imprescindíveis para a contagem e identificação da ecologia dos embutidos cárneos fermentados artesanais a fim de garantir a segurança de tais alimentos e promover uma certa padronização destes produtos, já que este conhecimento possibilita a formulação de culturas *starters* com microrganismos específicos, capazes de conservar as características regionais desejadas.

Grande parte dos estudos acerca deste assunto são realizados por meio de métodos microbiológicos clássicos, que tem como base a contagem em placa com a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC). Apesar de amplamente utilizado, este método apresenta limitações já que nem sempre é capaz de detectar o microbioma completo de uma amostra, não levando em considerações microrganismos que necessitam de meios complexos para se desenvolverem, além de ser um processo bastante trabalhoso e demandar muito tempo para obtenção de resultados (RANTSIOU *et al.*, 2005). Como alternativa mais rápida e específica para a identificação e quantificação da ecologia de alimentos fermentados, surgiram as análises metataxonômicas, cuja base é o sequenciamento genético. As técnicas moleculares são realizadas através da extração do DNA (ou RNA), fazendo uso dos marcadores moleculares 16S rRNA para bactérias e ITS para fungos. A coleta do material genético pode ser realizada a partir das colônias previamente isoladas (técnica dependente de cultivo) ou diretamente da amostra (técnica independente de cultivo), sendo essa última, o método que vem ganhando destaque nos últimos anos devido a sua rapidez, precisão e reprodutibilidade (CUNHA, 2016; CRISTOFF, 2016).

Tendo em vista que a quantificação e identificação de fungos em embutidos cárneos fermentados artesanais é fundamental para a segurança, para o aperfeiçoamento das características sensoriais e físico-químicas e para a verificação das condições higiênico-sanitária dos locais de produção, o presente trabalho aborda os métodos fenotípicos e

genotípicos utilizados para análise destes alimentos e discute os achados da literatura, visando entender de que forma o estudo metataxonômico contribui para cadeia produtiva de embutidos cárneos fermentados artesanais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Apresentar uma revisão bibliográfica narrativa acerca dos métodos genotípicos utilizados para identificação e quantificação de fungos em embutidos cárneos fermentados, bem como discutir a abordagem metataxonômica como uma alternativa para esse tipo de amostra.

1.1.2. Objetivos específicos

- Apresentar o método de produção de embutidos cárneos fermentados artesanais;
- Discutir os achados da literatura sobre identificação fúngica em embutidos cárneos através de métodos fenotípicos;
- Identificar os principais métodos genotípicos que estão sendo utilizados para identificação e caracterização de fungos presentes em produtos cárneos fermentados;
- Apresentar a abordagem metataxonômica como alternativa para identificação de fungos em amostra de produtos cárneos fermentados.

2. METODOLOGIA

A busca de artigos para a realização desta revisão bibliográfica de caráter narrativo foi realizada em bases de dados multidisciplinares como Scopus, Web Science e Periódicos CAPES. A busca foi realizada utilizando os seguintes termos e palavras chaves: *sausage*; *salami*; *metataxonomic*; *artisanal + sausage + metagenomic*; *artisanal sausage + fungi*; *next sequence genome + sausage + fungi*; *next sequence genome + salami + fungi*; *next sequence genome + salami + artisanal + fungi*. A partir de artigos sentinelas, foi feita a leitura das referências bibliográficas e assim foi realizada a compilação dos estudos. Foi utilizado como critério de exclusão o ano de publicação dos artigos, sendo que aqueles anteriores ao ano 2018 não foram incluídos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUTOS CÁRNEOS E SEUS DERIVADOS

Os alimentos de origem animal fazem parte da dieta humana há milhares de anos. Entre eles, está a carne, que é definida pela legislação brasileira como massas musculares e seus tecidos maturados, podendo incluir ou não a base óssea, oriunda de diversas espécies de animais abatidos sob inspeção veterinária (BRASIL, 2017). Apesar da população vegetariana e vegana estar crescendo nos últimos anos, a carne faz parte da rotina de grande parte da população mundial e é importante do ponto de vista nutricional, uma vez que sua composição inclui proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos essenciais, vitaminas do complexo B e teor significativo de ferro (LIPSKI, 2017). Em contrapartida, a carne é um alimento altamente perecível devido a sua elevada atividade de água, fator que torna tal matriz alimentícia propícia para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes ou até mesmo de microrganismos com potencial patogênico (HANGUI *et al.*, 2015).

Como alternativa, para aumentar a vida de prateleira das carnes, surgiram os derivados cárneos, que são produtos preparados a partir de carne, miúdos ou de partes comestíveis de animais, cujas propriedades são modificadas através da aplicação de tratamentos físicos, químicos ou biológicos, podendo envolver o acréscimo de ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia (BRASIL, 2017). Existem muitas possibilidades de processos a serem utilizados na produção de tais derivados, entre eles estão o cozimento, a salga, defumação, e desidratação, a cura ou a fermentação. A origem exata da aplicação destes processos em produtos cárneos não é conhecida, entretanto os primeiros registros escritos sobre salga e secagem de carnes datam por volta de 160 a.C. na Grécia Antiga (ZEUTHEN, 2007).

Dentre os derivados cárneos estão os embutidos que são definidos como produtos fabricados a partir de carnes ou órgãos comestíveis, que podem ser curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dissecados ou não, envolvido por uma tripa, sendo que esta pode ser de origem natural ou artificial (BRASIL, 2017). A procura por embutidos é alta devido ao apelo sensorial atribuído a este tipo de produto sendo que, na região sul do Brasil, os salames e a linguiça colonial são os embutidos de massa semi-crua que apresentam destaque em decorrência da forte influência dos imigrantes italianos e alemães (BACKES, 2011).

3.2 EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS ARTESANAIS

O mercado alimentício dispõe de uma grande variedade de embutidos cárneos fermentados, sendo que o salame e a linguiça colonial são os mais comuns na região sul do Brasil. Estes alimentos começaram a ser produzidos no país através da chegada de imigrantes italianos e alemães, pois antes que comessem a ser produzidos em escala industrial, eram fabricados de forma artesanal como fonte de renda para essas famílias (CASTILHO, 2014). Com o passar dos anos, as indústrias foram crescendo e os processos foram sendo padronizados, entretanto, a produção artesanal de embutidos cárneos fermentados ainda se faz presente, especialmente no oeste de Santa Catarina, onde a produção e comercialização de suínos e seus derivados em pequena escala é responsável por uma parte considerável da renda de pequenas famílias (OLIVEIRA, 2020).

Segundo a legislação brasileira, salame é o produto cárneo obtido de carne suína e de toucinho que pode conter ou não outros ingredientes, condimentado, embutido em envoltórios naturais ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não, e dessecado (BRASIL, 2017), sendo que a denominação de venda de salames industriais varia de acordo com a sua origem e seu processo de obtenção se diferenciando por diversos aspectos, como atividade de água e teor de umidade (BRASIL, 2000). Já a linguiça colonial é definida como o produto cárneo industrializado, fabricado exclusivamente a partir de carnes suínas, adicionado de toucinho, ingredientes, moído em granulometria variável, embutida em envoltório natural, curado, que passa por um processo rápido de fermentação, defumado e dessecado por tempo indicado pelo processo de fabricação (BRASIL, 2000).

A Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000 indica as características físico-químicas para cada tipo de embutido cárneo fermentado, sendo elas: atividade de água, teor de umidade, proteínas, gordura e carboidratos totais. A linguiça colonial se diferencia do restante dos embutidos apresentados na legislação por não apresentar exigência quanto ao teor de umidade. Em decorrência do rápido período de fermentação e maturação pelo qual este produto é submetido, a desidratação nem sempre ocorre de forma efetiva, sendo um fator preocupante do ponto de vista microbiológico, uma vez que a falta de controle deste parâmetro pode facilitar a proliferação de microrganismos indesejáveis na matriz alimentícia (BRASIL, 2000; BIASI, 2021).

Em decorrência do aumento da produção e comercialização de alimentos artesanais nos últimos anos, o Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019 foi implementado com o

objetivo de regulamentar a fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Tais alimentos, são definidos como aqueles preparados predominantemente com matérias-primas de produção própria de origem determinada, cuja elaboração é realizada dando preferência às técnicas manuais, que são submetidas a inspeção por órgãos governamentais oficiais e que conservam as propriedades tradicionais e culturais da região onde são produzidos. Os alimentos inspecionados recebem o selo ARTE e são facilmente identificados nas gôndolas dos supermercados, tornando a informação clara ao consumidor (BRASIL, 2019).

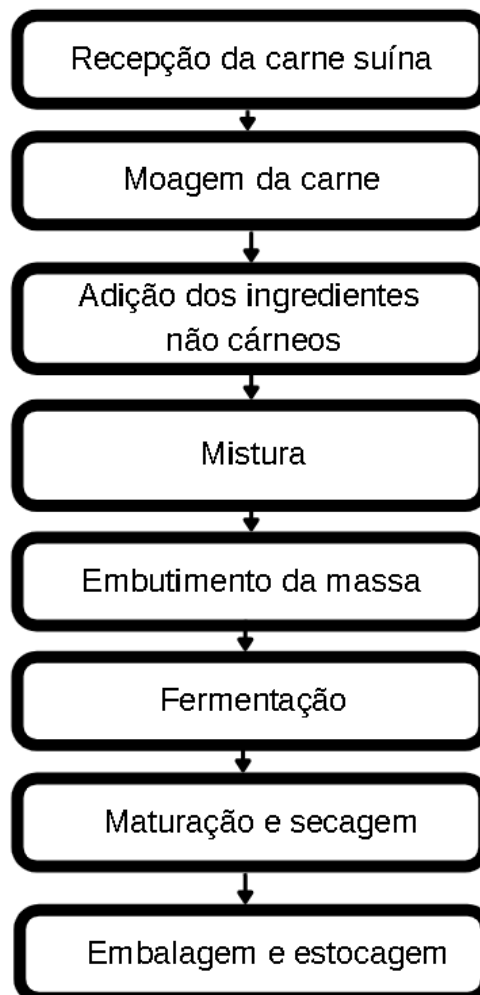
Dentre todas as etapas executadas para a elaboração de embutidos cárneos fermentados, a fermentação é uma etapa determinante porque é durante este processo que ocorrem mudanças bioquímicas, microbiológicas, físicas e sensoriais que possibilitam a obtenção do produto final (CASABURI et al. 2007). A fermentação de embutidos cárneos artesanais ocorre de forma empírica, sem adição de microrganismos iniciadores, sendo que os microrganismos responsáveis pelo processo são provenientes da microbiota autóctone do produto e do ambiente onde ele é produzido. A fermentação natural, sem utilização de culturas *starters*, possibilita o desenvolvimento de propriedades sensoriais desejadas que caracterizam a região de produção, entretanto inviabiliza a padronização dos embutidos cárneos fermentados artesanais, uma vez que a qualidade final dos produtos são dependentes de fatores variáveis, como a matéria prima utilizada, os equipamentos e o local de produção. Sabe-se que devido a diminuição do pH durante a fermentação, a baixa atividade de água alcançada no período de maturação e a adição de sais de cura, os embutidos fermentados são um meio improvável para manutenção de microrganismos com potencial patogênico mas, ainda assim, é uma possibilidade existente e deve ser considerada (SANTA; 2008, PEREIRA; BARCELLOS; BERSOT, 2019).

Deste modo, o conhecimento da ecologia microbiana de embutidos cárneos fermentados é de extrema importância a fim de garantir o fornecimento de alimentos seguros à população. Neste sentido, há estudos dedicados a explorar a microbiota dessa matriz alimentícia para possibilitar o desenvolvimento de novas culturas *starters* que sejam capazes de manter as propriedades características clássicas dos embutidos cárneos fermentados artesanais, garantindo a segurança do alimento.

3.2.1 Etapas do processamento de embutidos cárneos fermentados

O padrão de Identidade e Qualidade dos embutidos cárneos fermentados é fundamentado na Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000, que sofreu alterações pela Instrução Normativa nº 55 de 07 de julho de 2003. Tais padrões podem sofrer variações de acordo com o embutido fermentado de interesse, entretanto existem ingredientes que são de uso comum e obrigatório à todos os tipos, sendo eles: carne suína, toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio (BRASIL, 2000). O processo de fabricação deve seguir as medidas estipuladas pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF) a fim de que o produto seja seguro do ponto de vista higiênico-sanitário (BARROS, 2019). As etapas de elaboração de embutidos cárneos fermentados estão representadas na Figura 1.

Figura 1 - Etapas de elaboração de embutidos cárneos fermentados.



Fonte: adaptado de OLIVEIRA (2020).

A primeira etapa consiste no recebimento da matéria prima. É desejável que a carne suína utilizada tenha uma coloração mais acentuada e, por isso, deve-se priorizar carnes oriundas de animais mais velhos, uma vez que a carne dos mais jovens costuma ser mais clara, podendo afetar negativamente a aparência do produto final (MARTINS, 2006). Além disso, a carne deve apresentar pH na faixa entre 5,4 e 5,8 e após o recebimento, a carne *in natura* e o toucinho devem ser moídos, sendo que a granulometria pode variar conforme o embutido que se deseja produzir (CENCE, 2016; BRASIL, 2000).

Como etapa subsequente da moagem, há a adição dos demais ingredientes não cárneos, ou seja, o produto passa pelo processo de cura, que se resume a adição do restante das matérias primas obrigatórias (sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio) e dos ingredientes opcionais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Estes últimos variam de acordo com produto final que se deseja fabricar, podendo ser carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas e especiarias, substâncias glaceantes (revestimento externo) e as culturas *starters* como coadjuvantes de tecnologia, sendo que para o desenvolvimento de embutidos cárneos artesanais os microrganismos iniciadores geralmente não são utilizados. Logo após, todos os ingredientes são misturados a fim de se obter uma massa homogênea (CENCE, 2016; BRASIL, 2000).

O embutimento da massa é a etapa que dá a forma ao produto e, para tal processo, utiliza-se tripas naturais ou artificiais, sendo sua maioria a base de colágeno. A massa obtida na mistura passa por embutidoras que podem ser descontínuas (via pistão) ou contínuas (via vácuo), dependendo da necessidade do fabricante, cujo diâmetro varia de acordo com o embutido que se deseja produzir (GUEVARA, 2014). As tripas utilizadas devem ser adequadas a fim de permitir a eliminação de água durante a etapa de dessecação e também devem ter uma certa elasticidade a fim de suportar a retração decorrente da dessecação. A entrada de ar durante este processo é indesejável e deve ser controlada, uma vez que a microaerofilia é extremamente importante para o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas, espécies essenciais para o processo fermentativo (SCHMITT, 2017).

A defumação é um processo opcional e, quando realizado, pode ser aplicado antes ou após a fermentação, sendo que os principais objetivos deste processo são contribuir com a coloração, agregar compostos aromáticos e auxiliar na conservação do produto. Entretanto, é importante ressaltar que somente a defumação não é suficiente para promover a segurança do

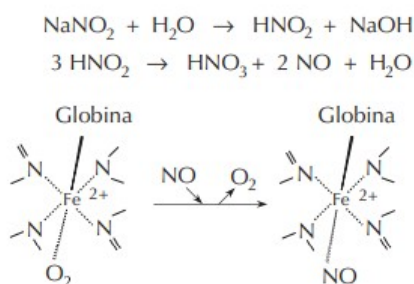
ponto de vista microbiológico, sendo imprescindível a aplicação de outros processos como cura, fermentação e secagem (SCHMITT, 2017).

A fermentação ocorre na massa embutida e provoca transformações físicas, bioquímicas e microbiológicas que influenciam diretamente no sabor, aroma, textura e vida útil do produto final (SCHMITT, 2017). Existem três principais fenômenos que ocorrem durante este processo: a fermentação de açúcares, a redução de nitrato em nitrito e a eliminação de água, sendo que a ocorrência de tais fenômenos podem ser divididas em duas fases distintas chamadas de fermentação e maturação. A fermentação ocorre nos sete dias iniciais em que a acidificação e a formação de cor acontece de forma simultânea e a maturação transcorre nos vinte e um dias restantes, quando o embutido é desidratado (OLIVEIRA, 2020; GUEVARA, 2014; CENCE, 2016).

A fermentação dos açúcares ocorre através da ação de bactérias ácido lácticas, sendo representados essencialmente por espécies de *Lactobacillus* homofermentativos, que geram o ácido láctico como produto e promovem a redução do pH do meio. Além de promover características sensoriais típicas de produtos fermentados, a acidificação é de extrema importância porque permite que as proteínas atinjam o seu ponto isoelétrico e percam, parcialmente, a capacidade de ligação com moléculas de água, ocasionando a desidratação do produto na etapa subsequente de maturação. É importante ressaltar ainda que a acidificação é relevante do ponto de vista da segurança do alimento porque inibe o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e daqueles com potencial deteriorante (HANSEN, 2002).

O nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-) pela ação de enzimas sintetizadas por bactérias presentes na fermentação, sendo as da família *Micrococcaceae* as principais representantes (GUEVARA, 2014). A cor vermelha escura característica dos embutidos cárneos fermentados é oriunda de um pigmento denominado nitrosilmioglobina, resultante da reação química demonstrada na Figura 2 (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 2 - Reação química para a formação de nitrosilmioglobina.



Fonte: DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA (2010).

Na presença de compostos redutores, o nitrito (NaNO_2) é reduzido a óxido nítrico (NO). Parte do nitrito presente no embutido, reage com moléculas de água formando ácido nitroso (HNO_2) que, sob condições de redução, também se deriva em óxido nítrico (NO). O óxido nítrico se liga ao ferro heme da mioglobina mudando a distribuição de elétrons na estrutura formando o complexo estável chamado nitrosilmioglobina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Esta é uma etapa importante do ponto de vista da qualidade e segurança porque, além de prover a coloração característica, os sais de sódio e potássio de nitritos e nitratos contribuem significativamente no desenvolvimento de aromas, retardam a rancificação e inibem o desenvolvimento de alguns microrganismos, especialmente a esporulação de *Clostridium botulinum*. É importante ressaltar que os nitritos estão associados com a formação de nitrosaminas que são compostos tóxicos ao organismo humano, uma vez que estas apresentam potencial carcinogênico (SCHMITT, 2017; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A fim de assegurar a saúde dos consumidores, a legislação brasileira estabelece limites máximos de nitrato e nitrito a serem utilizados em produtos cárneos, sendo 0,015 g/100g de NaNO_2 , 0,03g/100g de NaNO_3 e a soma dos nitritos e nitratos, determinados como resíduo máximo, não deve superar 0,015g/100g, expressa como nitrito de sódio ao final da fermentação (BRASIL, 2019).

As bactérias são microrganismos com papel fundamental no processo fermentativo e no desenvolvimento dos atributos sensoriais dos embutidos cárneos fermentados, entretanto os bolores e leveduras também são importantes para este processo, pois agregam características específicas e importantes para a qualidade final do produto. Os fungos estão presentes em diversos ambientes, sendo a maioria oriunda do solo ou ar (SILVA *et al*, 2017). Algumas espécies são utilizadas em matrizes alimentícias devido a sua capacidade de agregar sabor e odor característicos e são utilizadas como culturas starters em processos fermentativos, como no caso dos salames. Em contrapartida, a contagem elevada destes microrganismos, pode ser um indicativo de más condições higiênico-sanitárias durante o processamento, promovendo a deterioração dos alimentos e tornando-os nocivos à saúde humana uma vez que algumas espécies de fungos são capazes de produzir micotoxinas (PERRONE *et. al*, 2019).

Os bolores se desenvolvem em ambientes diversos devido a sua capacidade de utilizar como fonte de energia carbono oriundo de diversos nutrientes e, são flexíveis no que diz

respeito à utilização de nitrogênio, podendo ser nitrato, amônia e / ou nitrogênio orgânico e a maioria das espécies se desenvolvem na presença de oxigênio. Já as leveduras se desenvolvem em alimentos de forma mais limitada uma vez que não conseguem metabolizar nitratos e carboidratos complexos, algumas precisam de vitaminas para se desenvolver e outras não conseguem utilizar somente sacarose como fonte de carbono, sendo que algumas espécies crescem em meios com baixa (ou nenhuma) concentração de oxigênio e suportam diferentes concentrações de dióxido de carbono (CO₂). É importante ressaltar que estes microrganismos são bastante resistentes e se adaptam a diferentes condições ambientais uma vez que se desenvolvem em uma ampla faixa de pH (3-8) e tem como temperatura ótima de crescimento 25 a 28°C (SILVA *et al*, 2017).

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são os bolores mais comuns, sendo que a proliferação na superfície de salames ocorre naturalmente devido às condições favoráveis, mas também podem ser aplicados intencionalmente pelo fabricante a fim de garantir características sensoriais específicas que se desenvolvem durante a maturação do produto. O recobrimento da superfície por colônias fúngicas promove a desidratação homogênea, provocando a retirada lenta e progressiva da umidade, impactando positivamente a formação da crosta do produto. Além disso, dificulta a entrada de luz e oxigênio e, conseqüentemente, reduz a probabilidade de oxidação da gordura nos embutidos fermentados (CENCE, 2016). É importante salientar que a umidade relativa do ar da câmara de maturação não deve ultrapassar 80%, uma vez que acima disso, há margem para a incidência de fungos de espécies indesejadas que acarretam problemas do ponto de vista microbiológico. Em contrapartida, a umidade relativa não deve ser muito baixa, a fim de evitar que a desidratação parcial ocorra de forma inadequada e resulte em um produto final seco na superfície e com alto teor de umidade na parte interna (SCHMITT, 2017).

As leveduras estão presentes na massa e auxiliam de forma positiva o processo de fermentação e maturação dos embutidos cárneos fermentados. Estes microrganismos estão relacionados diretamente com o sabor e aroma característicos de tais produtos porque são capazes de metabolizar diferentes açúcares presentes na massa gerando uma diversidade de compostos voláteis como etanol, acetaldeído e acetato de etila. Além disso, as leveduras são capazes de metabolizar o ácido lático produzido pelas bactérias durante a fermentação, fator que evita a acidez excessiva dos embutidos cárneos fermentados uma vez que modificam o pH, deixando-o mais elevado (MENDONÇA *et al.*, 2012). Estudos apontam a ocorrência de diversos gêneros de leveduras ao longo do processo de fermentação e maturação.

Debaryomyces, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, sendo as espécies *C. zeylanoides* e *D. hansenii* são exemplos mais frequentemente encontrados em produtos cárneos (MI *et al.*, 2021; FLORES *et al.*, 2015).

A desidratação ocorre, predominantemente, durante a etapa de maturação e é decorrente do decréscimo do pH ao longo da fermentação. O meio ácido promove a desnaturação proteica, ou seja, as proteínas cárneas perdem a sua forma original assim que atingem seu ponto isoelétrico (actina pI 4,7; miosina pI 5,4) e, como consequência, há a diminuição da capacidade de retenção de água, resultando na desidratação do produto (GUEVARA, 2014; TRINDADE, 2015). Além disso, ao longo da maturação, ocorrem processos de proteólise e lipólise que contribuem de forma significativa para as características sensoriais dos embutidos cárneos fermentados, como aroma, sabor e estabilização da cor. O salame elimina cerca de 30 a 40% de sua massa inicial durante a maturação e recomenda-se que a secagem seja feita com temperatura, umidade relativa e velocidade de ventilação pré estabelecidas a fim de obter maior controle sobre o processo. Sendo assim, ao terminar todas as etapas, um conjunto de fatores (pH reduzido, a redução de nitrato em nitrito e a baixa atividade de água (aw)) torna o salame seguro para ser embalado e estocado para posterior comercialização em temperatura ambiente, sem necessidade de refrigeração (SCHMITT, 2017; LIPSKI, 2017). É importante ressaltar que o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para embutidos cárneos fermentados estabelece um teor de umidade máximo para cada tipo de salame, com exceção da linguiça colonial, cujo requisito não é especificado (BRASIL, 2000). Posto isto, quando produzidos de forma artesanal, tal teor deve ser considerado para que a classificação e denominação de venda do produto seja feita de forma correta. Para isso, o ideal seria que houvesse a padronização do processo deste tipo de produto a fim de estabelecer um ponto final de maturação a ser seguido pelos fabricantes.

A produção de embutidos cárneos fermentados artesanais geralmente não adota o uso de culturas *starters* uma vez que a fermentação ocorre de forma espontânea, entretanto é importante destacar que a utilização dessas culturas promovem um maior controle do processo. Sendo assim, o estudo aprofundado da ecologia destes produtos é de extrema importância a fim de conhecer as cepas indígenas para o tornar possível o desenvolvimento de culturas iniciadoras que conservem as características sensoriais típicas dos embutidos cárneos fermentados artesanais e que, ao mesmo tempo, garantam a segurança do alimento. De modo geral, a aplicação de bolores e leveduras tem como objetivo promover sabor através de reações bioquímicas, proteger o salame da proliferação de microrganismos indesejáveis,

retardar a rancificação, auxiliar na estabilização da cor e promover uma desidratação uniforme (CENCE, 2016). Neste sentido, a identificação de bolores ou leveduras importantes do ponto de vista tecnológico na fabricação de embutidos cárneos fermentados se torna fundamental para o entendimento da ecologia microbiana desses produtos.

3.3 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CLÁSSICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

As análises microbiológicas para identificação e quantificação de fungos em derivados cárneos são de extrema importância porque essa abordagem é uma medida de controle que impede que produtos contaminados cheguem até o consumidor final. Algumas espécies de fungos filamentosos são capazes de produzir micotoxinas que, quando ingeridas, provocam uma série de desordens metabólicas que desencadeiam efeitos adversos, tanto em seres humanos quanto em animais. Já algumas leveduras podem causar reações alérgicas graves em indivíduos imunossuprimidos (SILVA *et al.*, 2017; REIS, 2019). Em contrapartida, há espécies de fungos que podem acarretar benefícios tanto para o organismo humano, quanto para a parte tecnológica dos processos, auxiliando inclusive na prevenção do desenvolvimento de culturas patogênicas (PENNACCHIA *et al.*, 2008; LI, 2021).

A microbiologia clássica emprega o método de contagem padrão em placas para a identificação e quantificação de bolores e leveduras em alimentos, através da determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g). Existem diversas formas de plaqueamento das amostras, entretanto, para análise fúngica, recomenda-se o plaqueamento em superfície a fim de aumentar a exposição dos microrganismos ao oxigênio, essencial para a sua multiplicação (SILVA *et al.*, 2017). Existem algumas possibilidades de ágar a serem utilizados como meios de cultura para este fim e os mais comuns estão descritos no Quadro 1. Outra opção para a realização deste tipo de análise são os kits analíticos rápidos oficializados pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (CARDOSO, 2021).

Quadro 1 - Principais meios de cultura utilizados em análises microbiológicas fenotípicas para quantificação de bolores e leveduras em amostras de alimentos.

Ágar	Abreviação	Especificações
		Utilizado para amostras com $a_w > 0,95$. O

Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol	DRBC	cloranfenicol atua como inibidor de bactérias e o rosa de bengala restringe que a colônia se espalhe.
Ágar Dicloran Glicerol 18	DG18	Utilizados para amostras com $a_w \leq 0,95$. Além de cloranfenicol e rosa de bengala, este meio de cultura contém glicerol que atua reduzindo a a_w do meio.
Ágar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol	YEGC	Utilizado para amostras cuja microbiota predominante seja leveduras ou leveduras injuriadas pelo processamento.
Ágar Batata Dextrose Acidificado	PDA-AC	Utilizado para amostras de alimentos que não passaram por tratamento térmico, acidificação ou qualquer outro tipo de processo que possa acarretar em injúrias celulares.

Fonte: Adaptado de SILVA *et al.* (2017).

A Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018, oficializa os métodos analíticos oficiais de análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal. Para bolores e leveduras, as análises são fundamentadas na capacidade de tais microrganismo se desenvolverem em meios de cultura com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de 25 +- 1°C, sendo que a acidificação do meio a pH 3,5 +0,1 torna-o seletivo, uma vez que a maior parte das bactérias são inibidas nessas condições (RYU; WOLF-HALL, 2015).

As análises utilizando microbiologia clássica consistem em 5 etapas principais: pesagem, diluição, plaqueamento, incubação das placas por períodos pré estabelecidos de acordo com o objetivo da análise e, por fim, a contagem. Os resultados são constatados a partir da observação das colônias formadas considerando a sua morfologia celular. Testes são então realizados para a identificação dos microrganismos baseados em características específicas, como exemplo pode-se citar a capacidade de hidrolisar ureia ou de crescer em diferentes temperaturas e fontes de nitrogênio (KAZOU *et al.*, 2021).

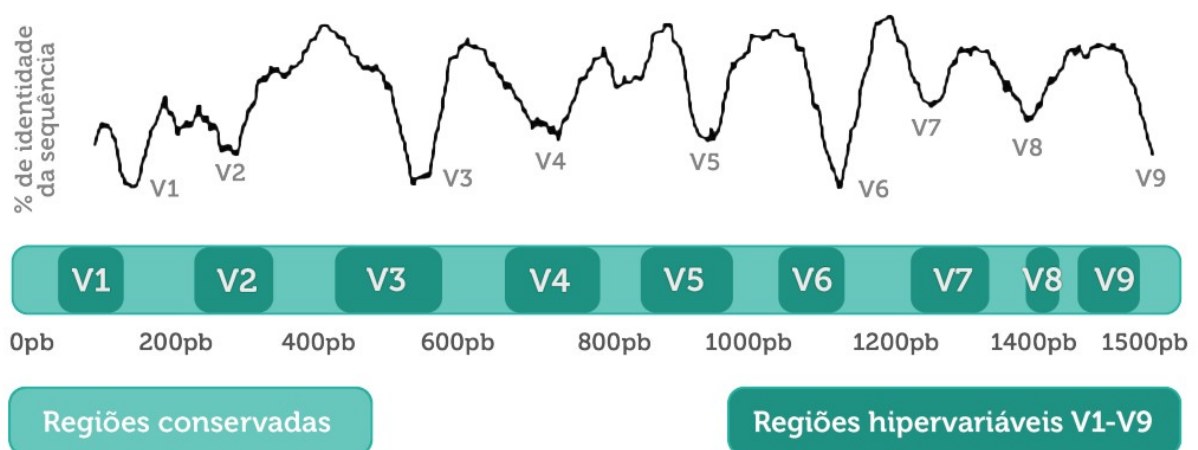
Apesar de muito utilizados, os métodos clássicos apresentam inconvenientes como a demora para obtenção dos resultados, a identificação limitada de microrganismos e falta de sensibilidade do método. Como alternativa, surgiram estudos aprofundados acerca da identificação genotípica desses microrganismos, cuja técnica permite identificar através de marcadores genômicos os microrganismos presentes em um alimento de forma muito mais rápida e precisa.

3.4. MÉTODOS GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

O DNA é considerado a molécula mais estudada do mundo e carrega todas as informações genéticas de um indivíduo, todavia, não são todas as regiões que podem ser utilizadas para fins de identificação de microrganismos. O reconhecimento de fungos e bactérias é possível graças a determinadas sequências de DNA que são instituídas a fim de estabelecer quais são os microrganismos pertencentes a uma mesma linhagem evolutiva, cujo nome são marcadores moleculares. Estes marcadores são considerados ideais quando possuem sítios variáveis que possibilitem uma boa resolução filogenética, não devendo apresentar uma evolução muito rápida nem uma taxa evolutiva muito lenta. O gene 16S rRNA é o marcador mais utilizado para a identificação de bactérias e archaea, enquanto que a região intergênica ITS é o marcador universal para detecção de fungos (CHRISTOFF, 2016).

O gene 16S rRNA está presente nos organismos procariotos e é considerado um marcador molecular ideal porque é constituído por regiões relativamente conservadas e 9 regiões hipervariáveis (Figura 3). As tecnologias de nova geração possibilitam a análise e leitura de regiões envolvendo mais de uma região hipervariável, fator importante para obter resultados fidedignos que abrangem a diversidade filogenética da amostra (SANTAMARIA *et al.*, 2012). A região V3 é onde se encontra o maior número de sítios variáveis na sequência e pode ser analisada juntamente com a V4 através de metodologias de nova geração. De modo geral, a sequência do gene 16S rRNA é adequada para identificar a ecologia bacteriana de amostras de alimentos, uma vez que as regiões hipervariadas são constituídas por sequências de nucleotídeos bastante variáveis de um microrganismo para outro (CHRISTOFF, 2016).

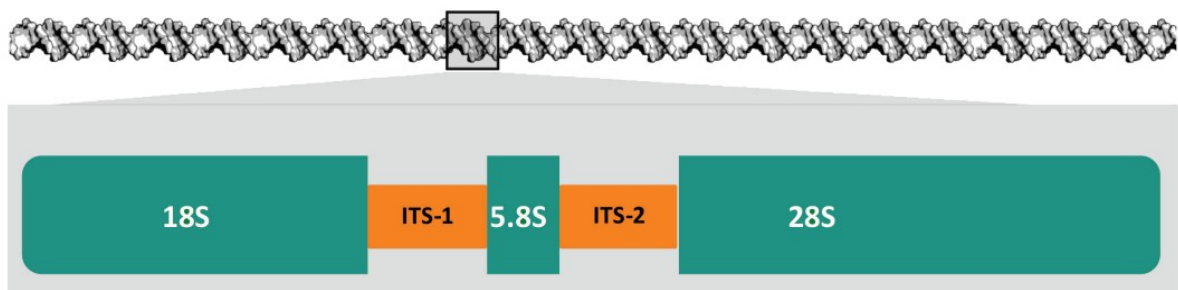
Figura 3 - Estrutura do gene 16S rRNA.



Fonte: CHRISTOFF (2016).

Os genes 18S, 5.8S e 28S são os constituintes das regiões conservadas do RNA ribossomal de seres eucariotos. Estes genes são separados por dois espaçadores internos denominados ITS1 e ITS2 (ITS, do inglês *Internal Transcribed Spacers*), que são considerados ótimos marcadores moleculares para a identificação de fungos por três motivos específicos (Figura 4). O primeiro deles corresponde ao alto grau de sensibilidade da metodologia, pois o número de cópias de ITS por célula é alto, podendo exceder 250 cópias, o que permite uma boa leitura e resolução de resultados para amostras com poucos microrganismos (CHRISTOFF, 2016). Além disso, as regiões ITS apresentam alto grau de variabilidade enquanto os genes flanqueadores são regiões altamente conservadas, o que é ideal para a realização de análises taxonômicas. Por fim, muitas sequências de DNA estão sendo descobertas e depositadas em bancos de dados online, o que possibilita o reconhecimento de espécies tendo como base a comparação entre os dados (SANTAMARIA *et al.*, 2012; CHRISTOFF, 2016).

Figura 4 - Estrutura que codifica o RNA ribossomal para eucariotos.



Fonte: CHRISTOFF (2016).

Hoje em dia, a tipagem por sequenciamento completo do genoma é uma tecnologia bastante utilizada e se destaca pela sua alta eficiência, uma vez que é capaz de identificar cepas de microrganismos que se diferenciam entre si somente por um nucleotídeo. Em contrapartida, a execução dessas técnicas ainda não são aplicadas em todos os laboratórios a nível mundial porque é uma metodologia com um custo elevado e que exige um conhecimento avançado de bioinformática, fator essencial para a correta interpretação dos dados. A padronização, tanto da realização dos métodos quanto da divulgação dos dados,

também é uma barreira e se faz necessário para melhorar a interpretação, o entendimento e a reprodutibilidade desta tecnologia (CUNHA, 2016).

Atualmente existem diversos métodos de tipagem genotípica microbiana e, entre eles, o mais difundido e utilizado é a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE - oriunda do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (CUNHA, 2016). Este método foi desenvolvido por Schwartz e Cantor, em 1984, e é considerado o padrão ouro para tipagem bacteriana. Para aplicação deste método, o DNA microbiano é extraído e clivado através da ação de enzimas específicas originando fragmentos de DNA de diversos tamanhos. Tais fragmentos são então separados através da eletroforese em gel de agarose de campo pulsado, cujo princípio se baseia na alternância da direção do campo elétrico e na capacidade de reorientação dos fragmentos de DNA. Sendo assim, as moléculas menores se reorientam de forma mais rápida enquanto que as maiores de forma mais lenta e, a diferença entre os tempos de migração dos fragmentos, permite a formação de bandas de DNA. A distância existente entre os fragmentos é então comparada com bandas padrões disponíveis em bancos de dados, o que possibilita a identificação dos microrganismos (CUNHA, 2016; LOPEZ-CANOVA *et al.*, 2019). Apesar de ser considerado padrão ouro e atender a todas os critérios para ser afirmado como um ótimo método de tipagem genotípica, a PFGE não se aplica para análise de microrganismos não cultiváveis, tornando-o limitado para muitos casos (LOPEZ-CANOVA *et al.*, 2019). Em consequência disso, metodologias baseadas em sequenciamento genético estão sendo cada vez mais estudadas e aprofundadas a fim de contornar tal limitação e entender a complexidade das comunidades microbianas constituintes da biosfera como um todo, inclusive dos alimentos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007).

Há diversas abordagens que possibilitam a tipagem genotípica direta de amostras. Entre elas, pode-se citar a Tipagem por Sequenciamento de Único Locus (SLST, oriunda do inglês *Single-locus Sequence Typing*), a Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Loci (MLST, proveniente do inglês *Multilocus Sequence Typing*) e a Tipagem por Sequenciamento Completo do Genoma (WGST, do inglês *Whole Genome Sequence Typing*), sendo essa última a metodologia ideal e mais indicada para o fornecimento de resultados com ótima resolução (CUNHA, 2016). Os estudos com sequenciamento genômico de alto desempenho são divididos em três gerações que se diferenciam entre si de acordo com as tecnologias utilizadas (OAKLEY, GONZALES-ESCALONA, MOLINA, 2015).

A primeira geração da WGST foi marcada por dois métodos: o de degradação química e o de interrupção de cadeia - Sanger. Ambos foram publicados em 1977 sendo que o método

de Sanger, cujo princípio se baseia na utilização da terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos, se sobressaiu popularmente graças a sua alta eficiência e baixa radioatividade (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). O método de Sanger sofreu diversas modificações ao longo dos anos, entretanto seguiu limitado por ser trabalhoso, caro e demorado e, por isso, deu lugar aos métodos de nova geração (NGS, oriundo do inglês *Next Generation Sequencing*) (OAKLEY, GONZALES-ESCALONA, MOLINA, 2015).

Os NGS abrangem os métodos de segunda e terceira geração. Os métodos de segunda geração surgiram em 2005 e foram os pioneiros na utilização de plataformas de sequenciamento de alto rendimento (HTS, do inglês *High-throughput Sequencing*), sendo que a tecnologia 454 Life Science, que foi posteriormente adquirida pela companhia Roche, possibilitou sequenciamentos em massa devido ao aumento de DNA que poderia ser analisado (HEATHER; CHAIN, 2016). As tecnologias de segunda geração se diferenciam das primeiras porque o sequenciamento é realizado sem a necessidade de clonar os fragmentos de DNA em vetores de multiplicação em bactérias ou leveduras, sendo que as moléculas de DNA são geradas através de fragmentação ou em reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Tal tecnologia foi aprimorada baseada no princípio de fluorescência de terminadores reversíveis e, ainda hoje, são técnicas bastante utilizadas (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). A primeira plataforma HTS foi a original 454, denominada GS20, que com o passar do tempo foi substituída pela 454 GS FLX (HEATHER; CHAIN, 2016). Posteriormente outras companhias, como a Illumina-Solexa e a Life Technology, desenvolveram novas técnicas para o sequenciamento utilizando outras plataformas como a HiSeq 2000, MiSeq, SOLid, Ion Torrent e Ion Proton (OAKLEY, GONZALES-ESCALONA, MOLINA, 2015).

A terceira geração de HTS surgiu em 2010 a fim de suprir as desvantagens das tecnologias de segunda geração tais como erros de nucleotídeos, o favorecimento de algumas sequências ou até mesmo a alteração da relação de frequência e abundância dos fragmentos de DNA constituintes das amostras antes e depois da amplificação. A característica que diferencia as tecnologias de terceira geração das demais é a capacidade de realizar tipagem genotípicas sem a necessidade de amplificação do DNA, podendo realizar a detecção diretamente de uma molécula (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Para tal tecnologia, as principais companhias que se destacam no mercado são a Pacific, a BioScience, a Oxford e a Nanopore (OAKLEY, GONZALES-ESCALONA, MOLINA, 2015).

Apesar do WGST ser a metodologia ideal e mais indicada para o fornecimento de resultados com ótima resolução, o sequenciamento do genoma completo de todos os microrganismos presentes em uma amostra de alimento é extremamente oneroso e necessita de uma grande capacidade analítica e recursos de bioinformática. Sendo assim, a utilização de apenas algumas regiões do gene 16S para bactérias e da região ITS para fungos é uma alternativa mais viável para a identificação e quantificação de todos os microrganismos presentes em amostras de alimentos (CHRISTOFF, 2016). Essa abordagem também é conhecida como metataxonômica.

A metataxonômica é um termo complexo cuja definição exata não existe, entretanto, de modo geral, está relacionado com o estudo e a identificação de microrganismos através de metodologias independentes de cultivo, resultando na caracterização de comunidades inteiras (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). Sendo assim, a metataxonômica é um processo de alto rendimento que permite a caracterização em larga escala de todo o conjunto de microrganismos presentes em uma determinada amostra (MARCHESI, RAVEL, 2015).

Estudos metataxonômicos acerca da microbiota dos alimentos têm papel fundamental para o desenvolvimento de novos produtos e para a segurança dos alimentos, além de contribuir significativamente para o progresso dos processos utilizados nas pequenas e grandes indústrias. Sabe-se que os embutidos cárneos fermentados são constituídos por uma microbiota complexa composta por bactérias, bolores e leveduras e que as principais espécies eram identificadas utilizando métodos pré-estabelecidos pela microbiologia tradicional, ou seja, tinham como base as características fenotípicas e bioquímicas dos isolados (FRANCIOSA *et al.*, 2018). Uma vez que tais métodos apresentam diversas limitações, como por exemplo a detecção somente de microrganismos cultiváveis e a identificação de apenas uma parte da verdadeira população microbiana, no início de 1990 surgiram metodologias inovadoras que utilizam o genoma como base para a identificação precisa de bactérias e fungos em diversas matrizes alimentícias (KERGOURLAY *et al.*, 2015), inclusive nos embutidos cárneos fermentados.

As técnicas de nova geração, através de diferentes tecnologias, revolucionaram a microbiologia permitindo que a ciência ultrapasse os limites das análises tradicionais e reconheça a ecologia e a diversidade microbiana dos alimentos. Sendo assim, a compressão da comunidade fúngica através de análises metataxonômicas de embutidos cárneos fermentados permite entender os mecanismos e as mudanças que ocorrem ao longo da fermentação e os impactos, tanto positivos quanto negativos, que estes microrganismos causam nas

propriedades organolépticas e na segurança destes alimentos (FRANCIOSA *et al.*, 2018; SANTIYANONT *et al.*, 2019).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS ARTESANAIS UTILIZANDO MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS TRADICIONAIS E GENOTÍPICOS

A microbiota de embutidos cárneos fermentados têm sido bastante estudada com três principais objetivos: entender a inter-relação existente entre a comunidade fúngica, a influência que tais microrganismo tem sobre as características sensoriais dos produtos e o controle da segurança destes alimentos através do reconhecimento de cepas com potencial deteriorante ou produtoras de micotoxinas. Para isso, os métodos de análises microbiológicas, tanto tradicionais quanto genotípicos, são amplamente utilizados por pesquisadores do mundo inteiro. Ainda que a legislação brasileira não estabeleça limites máximos ou mínimos de bolores e leveduras em salames, há estudos que utilizam a microbiologia clássica como abordagem para a contagem total de bolores e leveduras, cujo intuito principal é avaliar as condições higiênico-sanitárias utilizadas ao longo do processamento (CASARIL *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2019). Entretanto, a contagem em placas de bolores e leveduras, sem a identificação de tais microrganismos, pode ser considerada pouco relevante para este tipo de produto, uma vez que o reconhecimento dos microrganismos é crucial, tanto para o melhoramento dos atributos sensoriais, quanto para a tomada de decisão enquanto a ações preventivas para o desenvolvimento de microrganismos com potencial patogênico. O Quadro 2 apresenta alguns estudos de aplicação de métodos microbiológicos fenotípicos e genotípicos para identificação de fungos em embutidos cárneos fermentados.

Quadro 2 - Estudos de aplicação de métodos microbiológicos fenotípicos e genotípicos para identificação de fungos em embutidos cárneos fermentados.

Produto cárneo analisado	Região dos produtos	Metodologia	Microrganismos detectados	Principais conclusões	Fonte
Salame (Traditional salami)	Itália (região da Lombardia e Emilia Romagna)	<p>Fenotípica Ágar DG18 e DRBC para isolamento e contagem dos fungos.</p> <p>Genotípica Amplificação dos genes ITS1 e ITS4 com leitura dos fragmentos em PFGE.</p> <p>PCR em tempo real para amplificação do gene otanpsPN.</p>	<p><i>Penicillium nalgiovense</i>, <i>Penicillium solitum</i>, <i>Penicillium chrysogenum</i>, <i>Penicillium commune</i>, <i>Penicillium corylophilum</i>, <i>Penicillium citreonigrum</i>, <i>Penicillium crustosum</i>, <i>Aspergillus candidus</i> e <i>Aspergillus westerdijkiae</i> e outras espécies não identificadas genotipicamente correspondentes aos gêneros <i>Mucor</i>, <i>Cladosporium</i>, <i>Geotrichum</i>, <i>Eurotium</i> e <i>Fusarium</i> que não foram focadas no estudo.</p>	Os gêneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> foram os predominantes nas amostras analisadas. Foi observado que nem todas as cepas com potencial para produção de OTA são, de fato, capazes de produzir a micotoxina e que houve desconformidade entre a presença de OTA e a amplificação do gene otanpsPN, que pode ser explicada pela necessidade de condições específicas para a síntese de OTA	(Merla <i>et al.</i> , 2018)
Linguiças artesanais (Dry fermented)	Brasil (Rio Grande do Sul-Município)	<p>Fenotípica Ágar DG18 para isolamento e contagem dos</p>	<p><i>Aspergillus. candidus</i>, <i>Aspergillus montevidensis</i>, <i>Aspergillus niger complex</i>, <i>Aspergillus pseudoglaucus.</i>, <i>Mycelia sterilia</i>,</p>	O estudo concluiu que o ar oriundo das instalações das fábricas está diretamente relacionado com a contaminação das linguças	(Parussolo <i>et al.</i> , 2019)

sausage)	de Santa Maria)	fungos.	<p><i>Penicillium brevicompactum</i>, <i>Penicillium carneum</i>, <i>Penicillium chrysogenum</i>, <i>Penicillium corylophilum</i>, <i>Penicillium crustosum</i>, <i>Penicillium glabrum</i>, <i>Penicillium polonicum</i>, <i>Penicillium raistrickii</i>, <i>Penicillium spinulosum</i>, <i>Wallemiomycete sebi</i>, <i>leveduras</i>, <i>Aspergillus ruber</i>, <i>Aspergillus westerdijkiae</i>, <i>Penicillium griseofulvum</i>, <i>Penicillium italicum</i>, <i>Penicillium roqueforti</i>, <i>Penicillium viridicatum</i> e outras espécies não discriminadas correspondentes aos gêneros <i>Cladosporium sp.</i>, <i>Talaromyces sp</i> e <i>Curvularia sp.</i></p>	<p>artesanais, originando o fluxo contínuo de contaminação ar-linguiça-ar. Ainda que as duas indústrias participantes do estudo se localizam na mesma cidade, as amostras apresentaram fungos variados, sendo que a presença de <i>A. westerdijkiae</i> no ar e na superfície das linguiças oriunda de uma das fábricas, é deveras preocupante, uma vez que este fungo é produtor de OTA.</p>
Linguiças caseiras curadas (Dry cured sausage)	Argentina (diversas localidades das províncias de Buenos Aires, Córdoba e La Pampa).	<p>Fenotípica Ágar DG18 e Ágar MEA para identificação de fungos xerofílicos e cultiváveis totais, respectivamente.</p>	<p><i>Penicillium nalgiovense</i>, <i>Penicillium implicatum</i>, <i>Penicillium chrysogenum</i>, <i>Penicillium brevicompactum</i>, <i>Penicillium citrinum</i>, <i>Penicillium griseofulvum</i>, <i>Mucor tacemosus</i>, <i>Mucor circinelloides</i>, <i>Mucor hiemalis</i>, <i>Mucor piriformis</i>, <i>Aspergillus ochraceus</i>, <i>Cladosporium cladosporoides</i>, <i>Cladosporium sphaerospermum</i>, <i>Cladosporium herbarum</i>,</p>	<p>O estudo relatou a predominância de <i>Penicillium nalgiovense</i> em grande parte das amostras analisadas, sendo que este fungo proporciona uma aparência externa desejável (cor, textura e sabor). Entretanto, detectou-se a presença de fungos produtores de micotoxinas, como <i>P. chrysogenum</i> (produtor de roquefortina C, toxina PR, penicilina e ácidos secalônicos), <i>P.</i></p>

(Vila *et. al*, 2019)

marcadores moleculares ITS1 e ITS4. A amplificação foi feita por PCR e os produtos foram separados por PFGE.

Scopulariopsis candida, *Geotrichum candidum* *brevicompectum* (produtor de ácido micofenólico), *P. citrinum* (produtor de citrinina) e *P. griseofulvum* (que produz patulina, ácido ciclopiazônico, roquefortina C e griseofulvina).

Linguíça colonial (Artisanal colonial salami - Type dry fermented sausage)	Brasil (Santa Catarina - Municípios de Piratuba, Herval Velho, Jaborá, Concórdia, Luzerna, Videira, Salto Veloso, Tangará, Caçador, Iomerê e Lacerdópolis).	<p>Fenotípico Ágar DG18 para contagem de fungos.</p> <p>Genotípico HTS A região ITS1 foi amplificada utilizando os primers ITS1 e ITS2. Os produtos da PCR foram analisados através da plataforma MiSeq Illumina</p>	<p><i>Apiotrichum montevidense</i>, <i>Aspergillus cibarius</i>, <i>Aspergillus ruber</i>, <i>Candida metapsilosis</i>, <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Candida tropicalis</i>, <i>Cladosporium delicatulum</i>, <i>Cryptococcus sp.</i>, <i>Cyberlindnera mississippiensis</i>, <i>Debaryomyces hansenii</i>, <i>Fusarium denticulatum</i>, <i>Galactomyces sp.</i>, <i>Geotrichum candidum</i>, <i>Hyphopichia burtonii</i>, <i>Kodamaea ohmeri</i>, <i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>, <i>Lasiodiplodia jatrofiphicola</i>, <i>Leucosporidium yakuticum</i>, <i>Meyerozyma caribbica</i>, <i>Mrakia sp.</i>, <i>Penicillium thymicola</i>, <i>Pichia kudriavzevii</i>, <i>Suhomyces xylopsoci</i>, <i>Wallemia mellicola</i>, <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>, <i>Yarrowia galli</i>,</p>	<p>O estudo mostrou que <i>Debaryomyces hansenii</i>, <i>Candida zeylanoides</i>, <i>Yarrowia galli</i> e <i>Kodamaea ohmeri</i> foram as leveduras predominantes nas amostras enquanto <i>Aspergillus cibarius</i>, <i>Penicillium thymicola</i> e <i>Geotrichum candidum</i> foram o os fungos filamentosos de maior abundância.</p> <p>(Degenhardt et al., 2021)</p>
--	--	--	---	---

			<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida atlantica</i> , <i>Candida palmioleophila</i> , <i>Candida zeylanoides</i>	
Linguiça artesanal (Traditional dry sausage)	5 regiões do Nordeste da China (Harbin, Daqing, Suihua, Hegang e Mudanjiang)	<p>Fenotípica Ágar rosa de bengala para contagem de bolores e leveduras</p> <p>Genotípica Amplificação da região ITS2 utilizando primers específicos (2024F e 2409R). Os produtos da PCR foram separados por PFGE.</p>	<p><i>Aspergillus sydowii</i>, <i>Penicillium expansum</i>, <i>Mucor circinelloides</i>, <i>Botryosphaeria ramosa</i>, <i>Epicoccum plurivorum</i>, <i>Aspergillus chevalieri</i>, <i>Neopestalotiopsis clavispora</i>, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, <i>Rhizopus arrhizus</i>, <i>Aspergillus niger</i>, <i>Penicillium spinulosum</i>, <i>Trichosporon caseorum</i>, <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida metapsilosis</i>, <i>Cutaneotrichosporon curvatus</i>, <i>Aspergillus carsiellus</i>, <i>Lasiodiplodia theobromae</i>, <i>Aspergillus penicillioides</i>, <i>Torulaspora delbrueckii</i>, <i>Monascus purpureus</i>, <i>Xeromyces bisporus</i>, <i>Tausonia pullulans</i>, <i>Alternaria tenuissima</i>, <i>Didymella glomerata</i>, <i>Aspergillus pseudoglaucus</i>, <i>Alternaria alternata</i>, <i>Pichia kudriavzevii</i>, <i>Trichosporon asahii</i>, <i>Debaryomyces hansenii</i>, <i>Candida</i></p>	<p>O estudo revelou que existem 8 principais fungos (<i>D. hansenii</i>, <i>C. zeylanoides</i>, <i>T. asahii</i>, <i>A. pseudoglaucus</i>, <i>A. sydowii</i>, <i>P. expansum</i>, <i>A. alternata</i>, e <i>A. tenuissima</i>) que contribuem de forma importante para a formação de compostos voláteis da linguiça artesanal, sendo que o <i>D. hansenii</i> é o principal fungo responsável pela formação de compostos voláteis essenciais e característicos do produto.</p> <p>(Wen <i>et al.</i>, 2021)</p>

Embutidos fermentados (Raw fermented sausages)	Áustria	<p>Genotípico Amplificação da região ITS2 utilizando os primers ITS3-5' e ITS4-5'. O sequenciamento foi feito na plataforma MiSeq Illumina.</p>	<p><i>Calophoma sandfjordenica</i>, <i>Itersonilia perplexans</i>, <i>Alternaria alternata</i>, <i>Debaryomyces hansenii</i>, <i>Candida zeylanoides</i>, <i>Heterosphaeria veratri</i>, <i>Mycosphaerella tassiana</i>, <i>Alternaria infectoria</i>, gênero <i>debaryomyces</i>, <i>alternaria</i>, <i>Cladosporium cladosporioides</i>, <i>Typhula micans</i>, <i>Vishniacozyma victoriae</i>, <i>Filobasidium tepposum</i>, <i>Filobasidium wieringae</i>, <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Holtermanniella takashimae</i> e outras espécies não discriminadas correspondentes fungos da ordem <i>Capnodiales</i>, fungos da família <i>Didymellaceae</i>, fungos do gênero <i>Penicillium</i>.</p>	<p>O estudo revelou que a micobiota central das amostras analisadas eram compostas por fungos das espécies <i>Alternaria alternata</i>, <i>Mycosphaerella tassiana</i>, <i>Cladosporium cladosporioides</i>, <i>Candida zeylanoides</i>, <i>Tausonia pullulans</i>, <i>Debaryomyces hansenii</i> e <i>Vishniacozyma victoriae</i>. Além disso, os resultados mostraram que, quando comparado a comunidade bacteriana, a comunidade fúngica teve um comportamento mais estável e heterogêneo ao longo do processo de fermentação dos embutidos cárneos.</p>	(Zwirzitz et al., 2021)
Linguiça artesanal (Traditional dry fermented sausages)	5 regiões do Nordeste da China (Harbin, Daqing, Suihua,	<p>Fenotípica Ágar Extrato de Levedura Peptona Dextrose (YPD)</p> <p>Genotípica Amplificação da</p>	<p>Foram isoladas o total de 46 cepas de leveduras correspondentes a 12 espécies diferentes: <i>Debaryomyces hansenii</i>, <i>Candida zeylanoides</i>, <i>Trichosporon asahii</i>, <i>Trichosporon asteroides</i>,</p>	<p>O estudo revelou que 7 cepas isoladas (<i>D. hansenii</i> HRB2, SH4 e HG2; <i>T. delbrueckii</i> DQ3 e HG7; <i>P. kudriavzevii</i> MDJ1 e <i>C. zeylanoides</i> DQ7) demonstraram potencial para produção de ácidos, alcoóis e ésteres</p>	(Wen et al., 2022)

Hegang e Mudanjiang)	região ITS utilizando os marcadores moleculares ITS1 e ITS4. Os produtos da PCR foram separados por PFGE.	<i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Yarrowia divulgata</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Yarrowia galli</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Candida metapsilosis</i> e <i>Trichosporon coremiiforme</i> .	mostrando-se importantes para a formação dos compostos aromática da linguiça. A cepa. <i>D. hansenii</i> SH4 se revelou como o melhor produtor de sabor, pois produziu vários compostos com os maiores OAVs em todos os modelos.
----------------------	---	--	--

DG18: ágar dicloran glicerol 18; DRBC: ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol; HTS: sequenciamento de alto rendimento; ITS: espaçador transcrito interno; MEA: ágar extrato de malte; OAV: valores de atividade de odor; OTA: ocratoxina A; PCR: reação em cadeia de polimerase; PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado; YPD: ágar extrato de levedura peptona dextrose.

Fonte: do autor (2022).

Parussolo *et al.* (2019) analisaram a presença de fungos no ar da área de produção, nas matérias primas e na superfície de linguiças fermentadas artesanais oriundas de duas indústrias diferentes localizadas em Santa Maria, RS (Quadro 2). As amostras foram coletadas nos dias 0, 7 e 14 de produção e foram inoculadas em ágar DG18 a 25°C durante 7 dias. Foi relatado que, apesar da identificação de espécies de leveduras e da predominância de *Cladosporium sp.*, as matérias-primas apresentaram papel secundário na contaminação das linguiças. Em contrapartida, a inter-relação entre os fungos detectados no ar e na superfície das linguiças ficou evidente. *Aspergillus pseudoglaucus* representou 40% dos fungos identificados no ar externo de uma das indústrias e foi identificado na superfície das linguiças no sétimo dia de maturação. Tal ocorrência paralela também aconteceu com *Penicillium glabrum*, fator preocupante uma vez que este fungo é produtor de alguns metabólitos tóxicos. *Cladosporium sp.* e leveduras predominaram tanto no ar quanto nas superfícies das linguiças, o que vai de encontro ao estudo de Asefa *et al.* (2010), que verificaram que as leveduras também eram predominantes na superfície de embutidos cárneos fermentados ao longo de todo o processo, tendo seu desenvolvimento inibido somente após a defumação. *Cladosporium sp.* é considerado um dos fungos mais frequente em ambientes internos e externos, assim como em ambientes de fabricação de produtos cárneos. Apesar de estar relacionado com a deterioração dos embutidos, a espécie *Cladosporium cladosporioides* está sendo investigado como inibidor de espécies patogênicas, uma vez que estudos *in vitro* relataram que este microrganismo pode retardar em até 20 dias o desenvolvimento de conídios de espécies como *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *Fusarium verticillioides* (ANGÉLICO, 2012). Além dos fungos já citados, Parussolo *et al.* (2019) identificaram a presença de *A. westerdijkiae* tanto na superfície das linguiças, quanto no ar das indústrias, fato bastante preocupante uma vez que este fungo é produtor de ocratoxina A - micotoxina nociva à saúde humana. Segundo os autores, a lavagem da tripa com o objetivo de remover fungos da superfície é bastante comum no Brasil, entretanto deve ser realizada com cautela porque pode prejudicar o processo de maturação das linguiças e, além disso, pode disseminar esporos fúngicos no ar, ocasionando possíveis contaminações em linguiças frescas. É importante ressaltar que, como o método de análise utilizado neste estudo foi a contagem padrão em placas, em muitos casos, o número de colônias identificadas nas amostras de ar foi superior ao limite máximo de quantificação do amostrador de ar utilizado, podendo gerar resultados contestáveis. Além disso, este método não possibilitou a identificação precisa das leveduras presentes nas amostras. Em vista da prevenção da ocorrência e multiplicação de bolores

indesejáveis, muitos produtos alimentícios tradicionalmente obtidos por fermentação espontânea agora estão sendo produzidos com o uso de culturas iniciadoras para fornecer sabor padronizado e segurança microbiológica e toxicológica (CRUXEN *et al.*, 2019).

Penicillium nalgiovense é uma espécie de fungo considerada segura enquanto a produção de micotoxinas e é comum de ser utilizada como cultura iniciadora, uma vez que deixa a superfície dos embutidos cárneos fermentados com um aspecto homogêneo e aveludado, que agrada os consumidores (LUDEMANN *et al.*, 2009). A fim de analisar a microbiota de embutidos cárneos fermentados oriundos de 3 regiões da Argentina (Buenos Aires, Córdoba e La Paz) e caracterizar as populações de *Penicillium nalgiovense*, Vila *et al.* (2019) realizaram um estudo utilizando metodologia dependente de cultivo (Quadro 2). Eles coletaram amostras das superfícies dos embutidos, realizaram a inoculação em placas de Petri contendo ágar DG18 e MEA (Malt Extrat Agar), incubaram a 25°C durante 7 dias e realizaram a contagem de *Penicillium spp.*, *P. nalgiovense* e outros gêneros presentes na superfície dos embutidos. A identificação fenotípica dos microrganismos foi realizada com base nas características morfológicas das colônias, sendo que as colônias de *Penicillium nalgiovense* foram diferenciadas em 6 biótipos de acordo com o diâmetro das colônias, coloração dos conídios e grau de esporulação. Para confirmar a nível molecular a identidade dos isolados de *Penicillium nalgiovense*, o espaçador transcrito interno (ITS) foi amplificado por meio de PCR utilizando as regiões ITS1 e ITS4 e os fragmentos obtidos foram separados por PFGE. Das 37 amostras analisadas, obteve-se 196 isolados de fungos constituídos por 6 gêneros e 17 espécies diferentes, sendo que 77% desses fungos pertenciam ao gênero *Penicillium*. A espécie *Penicillium nalgiovense* prevaleceu em todas as amostras, com exceção somente de 2 localidades (Colônia Barón e Alpachiri na província de La Pampa), onde não foi isolado. Tal resultado vai de encontro a um estudo mais antigo realizado com embutidos cárneos fermentados artesanais oriundo da província de Colonia Caroya (Cordoba), em que os autores avaliaram a microbiota presente na superfície de tais alimentos produzidos em duas estações diferentes: inverno e verão (CANEL *et al.*, 2013). Assim como Vila *et al.* (2019), eles constataram a predominância de *Penicillium nalgiovense*, uma vez que este fungo foi encontrado em 100% das amostras de embutidos cárneos analisadas. Já na Europa, alguns estudos também observaram a prevalência do gênero *Penicillium* em embutidos cárneos, incluindo as espécies de *P. nalgiovense*, *P. solitum* e *P. olsonii* (SONKAK *et al.* 2010; ASEFA *et al.*, 2010). Vila *et al.* (2019) identificaram ainda espécies com potencial toxigênico, como *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum* em

todos os locais com frequência <40%. Além disso, *Aspergillus ochraceus*, fungo produtor de ocratoxina A (OTA), também foi observado. Canel *et al.* (2013) encontraram *Aspergillus ochraceus* nos embutidos cárneos fermentados produzidos no verão e atribuíram a presença deste fungo às altas temperaturas ambientais e a falta de controle da temperatura das câmaras de maturação. Acerca dos isolados *Penicillium nalgiovense*, observou-se que cada região apresentou a prevalência de um biótipo e os resultados obtidos da análise metagenômica confirmou a identidade dos isolados, pois demonstrou 100% de homologia com a cepa utilizada como referência (VILA *et al.*, 2019). Dessa forma, pode-se inferir que *Penicillium nalgiovense* é um fungo comum de ser encontrado na superfície de embutidos cárneos fermentados artesanais fabricados na Argentina, entretanto também é encontrado em embutidos oriundos de outras regiões do mundo. Se aliado a outros microrganismos típicos e exclusivos de uma determinada região, seria possível obter uma cultura *starter* com características importantes, como a textura e a aparência aveludada desejada neste tipo de produto.

Tendo em vista que algumas espécies de fungos são produtoras de micotoxinas, a identificação de cepas produtoras destes metabólitos tóxicos é imprescindível para entender quais condições favorecem a sua proliferação e quais fatores devem ser considerados no momento da produção de embutidos cárneos fermentados a fim de evitar o seu desenvolvimento. Merla *et al.* (2018) avaliaram a presença de ocratoxina A (OTA) e de fungos produtores da micotoxina em salames maturados por pelo menos 30 dias, produzidos na região norte da Itália (Quadro 2). A identificação dos fungos foi realizada por meio de métodos fenotípicos e foram isolados 247 fungos, sendo que três isolados corresponderam a *Aspergillus westerdijkiae*, fungo produtor de OTA. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram predominantes nas amostras analisadas, entretanto encontrou-se também os gêneros *Mucor*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Eurotium* e *Fusarium* em concentrações menores. A nível de espécie, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium solitum*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus candidus* foram os mais predominantes, sendo que a prevalência do gênero *Penicillium* pode ser justificada pela temperatura das salas de maturação dos salames (10 - 22°C). A presença de OTA nos salames foi analisada através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e foi detectada em 13 das 133 amostras analisadas. Com o intuito de averiguar a relação dos fungos isolados com a presença de OTA nos salames, os pesquisadores realizaram a extração do DNA de 19 isolados de *Aspergillus*, de 94 isolados de *Penicillium* e de 19 tripas de salames (sendo 12 tripas coletadas de salames positivos para

OTA e 7 negativos). Os marcadores moleculares universais ITS1 e ITS2 foram utilizados para amplificação da região ITS e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose. Através de PCR em tempo real, foi realizada a amplificação do fragmento do gene do peptídeo sintetase não ribossomal, chamado otanpsPN, responsável por codificar uma enzima chave na biossíntese de OTA. Eles observaram que nenhuma das amostras de DNA oriunda dos fungos isolados testou positivo para a sequência alvo do gene otanpsPN e que dos três isolados de *A. westerdijkiae*, apenas um produziu ocratoxina A quando submetido a condições ideais de temperatura, aw, pH e disponibilidade de nutrientes. Tal fato deixa claro que nem todas as cepas com potencial para produção de OTA são, de fato, capazes de produzir a micotoxina quando as condições ótimas não são alcançadas. Já das 19 amostras de DNA coletadas diretamente das tripas de salame, 14 obtiveram resultado positivo para a presença do gene otanpsPN, sendo que 11 positivaram tanto para o gene otanpsPN quanto para a um fragmento denominado otapks, que é específico de *P. nordicum*, fungo produtor de OTA. O gene otanpsPN foi detectado em dez salames onde a OTA foi quantificado acima de 1 µg/kg de carne. Já em dois salames que apresentaram OTA, o gene otanpsPN nem o otapks foi detectado, o que sugere que a OTA presente é derivada dos tecidos de suínos utilizados no preparo dos salames, proveniente da alimentação dos animais com rações contaminadas. Dentre os 7 salames analisados que testaram negativos para a presença de OTA, 4 apresentaram resultados positivos para a amplificação do gene otanpsPN. A desconformidade entre a ausência da micotoxina e a amplificação dos gene otanpsPN pode ser explicada pela necessidade de condições específicas para a síntese de OTA, bem como temperatura, atividade de água, pH e nutrientes disponíveis no meio. Além disso, o estudo não detectou nenhum isolado de *P. nordicum*, entretanto, 11 tripas testaram positivas para otapks, sendo que uma delas testou positivo para ambos os genes (otanpsPN e otapks), mas não foi possível detectar a espécie porque o fungo não apresentava estruturas reprodutivas, o que inviabilizou a sua classificação por método cultura-dependente. Levando em consideração que as amostras analisadas foram de salames com pelo menos 30 dias de maturação e que *P. nordicum* é adepto de meios com alta atividade de água, sugere-se que este é um microrganismo presente no estágio inicial de maturação, não estando viável para ser isolado em estágios mais avançados. Perante ao exposto, entende-se que seria interessante a aplicação de métodos independentes de cultivo para a identificação completa da microbiota das amostras analisadas, incluindo as cepas não ativas de *P. nordicum*.

Em paralelo com Merla *et al.* (2018), um estudo mais recente avaliou a relação entre a síntese de OTA por *P. nordicum* com os parâmetros de processamento (interação de umidade relativa (UR) x temperatura x tempo de maturação) no progresso de pH e atividade de água (aw) ao longo dos estágios de maturação de embutidos cárneos fermentados produzidos na Espanha (DELGADO *et al.*, 2021). Os autores inocularam cepas de *P. nordicum* em 27 amostras de embutidos, acomodaram em câmaras de maturação durante 26 dias, variando a temperatura e a UR do ar e verificaram as alterações na expressão dos genes *otapks* e *otanps* por PCR em tempo real de transcrição reversa (RT-qPCR). Observou-se que a aw foi um fator impactante na produção da micotoxina, sendo que as duas maiores concentrações de OTA foram detectadas no décimo oitavo dia de maturação, quando a aw chegou a 0,92 e a UR era de 84%, e ao fim do tempo de maturação, quando a aw era de 0,87. Estudos relatam que há mais de uma condição ótima para a síntese de OTA por *P. nordicum*, sendo: 10-20°C e aw 0,90; 25°C e aw 0,90 em embutidos cárneos fermentados ou ainda a aw 0,93 em carne suína curada a seco (RODRIGUEZ *et al.*, 2015; BATTILANI *et al.*, 2010), o que vai de encontro ao primeiro pico de OTA encontrado por Delgado *et al.* (2021). Estudos revelaram que *P. nordicum* é capaz de crescer e produzir micotoxina em ambientes ricos em NaCl e com baixa atividade de água, assim como é o meio dos embutidos cárneos fermentados ao fim da maturação (DELGADO *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; SCHMIDT-HEYDT *et al.*, 2012), o que explica o segundo pico de produção de OTA nos embutidos verificado por Delgado *et al.* (2021). Além disso, observou-se uma diminuição da concentração de OTA do dia 20 ao dia 24 de maturação, indicando que durante a adaptação ao estresse hídrico e osmótico, *P. nordicum* tem menor capacidade de produção da toxina. Dessa maneira, o controle de temperatura das câmaras de maturação e o encurtamento do processo de maturação podem ser alternativas para evitar o desenvolvimento dessa espécie de microrganismo (DELGADO *et al.*, 2021). É importante ressaltar que outras possibilidades estão sendo exploradas como medidas de controle para o desenvolvimento de micotoxinas, incluindo OTA, em produtos cárneos fermentados. Uma delas é a utilização de *P. nalgiovensis* como cultura protetora para diminuir os riscos de contaminação por OTA, pois estes microrganismos são capazes de controlar a aw e a expressão do gene *otapks*, deixando *P. nordicum* em desvantagem para seu desenvolvimento (BERNALDÉZ *et al.*, 2013). Outras pesquisas abordam alternativas de antifúngicos naturais, como utilização de óleos essenciais (OE) de diversas origens, sendo que o OE de manjerição e de cominho demonstraram bons

resultados na inibição de bolores isolados da superfície de embutidos fermentados (KOCIC-TANACKOV *et al.*, 2020).

Considerando que linguças coloniais são muito consumidas na região sul do Brasil e que, devido a forma como são fabricadas e comercializadas (maior aw), apresentam uma maior propensão ao desenvolvimento de microrganismos com potencial patogênico, Degenhardt *et al.* (2021) analisaram a microbiota desses produtos oriundas de diversos municípios de Santa Catarina (Quadro 2). Para isso, eles utilizaram métodos dependentes e independentes de cultivo. As análises fenotípicas de bolores e leveduras foram realizadas através da inoculação das amostras em ágar DG18 e incubação das placas a 25°C durante 5 - 7 dias. A observação da morfologia das colônias permitiu identificar a presença de bactérias ácido lácticas, leveduras, enterococos e bolores em todas as amostras, entretanto, não foram identificadas espécies com potencial patogênico. Através de análises físico-químicas, observou-se que o pH das amostras foi maior que 5,0, o que permite inferir que as linguças eram de baixa acidez. Este fator explica a alta umidade desse tipo de embutido cárneo fermentado ao longo da maturação, pois o pH elevado não favorece a desnaturação proteica, fazendo com que essas moléculas retenham água ao invés de eliminar. Para a identificação taxonômica da microbiota das linguças coloniais, os autores utilizaram a plataforma Miseq Illumina utilizando as regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA para bactérias e as regiões ITS1 e ITS2 para fungos. A nível de levedura, *Debaryomyces hanseni*, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia galli* e *Kodamaea ohmeri* foram as espécies predominantes nas amostras. Enquanto aos fungos filamentosos, as três espécies predominantes nas amostras foram *Aspergillus cibarius*, *Penicillium thymicola* e *Geotrichum candidum*. *Debaryomyces hanseni* é uma espécie que vem sendo bastante estudada nos últimos anos devido ao seu potencial probiótico, nutricional e biotecnológico, entretanto, algumas pesquisas mostram que essa levedura pode estar envolvida em processos inflamatórios dos tecidos da mucosa e na doença de Crohn (PRISTA *et al.*, 2016; ANGULO *et al.*, 2020; JAIN *et al.*, 2021). Com exceção da *Debaryomyces hanseni*, que é identificada em grande parte dos estudos envolvendo análise metagenômica de embutidos cárneos fermentados, o restante dos fungos predominantes nas linguças coloniais são espécie menos abundantes ou até mesmo incomuns nos embutidos cárneos fermentados oriundos de outras regiões. Tal fato reafirma que a microbiota destes alimentos tem uma relação direta com fatores extrínsecos, como ambiente, ingredientes e modo de preparo.

Sabendo que os embutidos cárneos artesanais têm sabor e aromas variados de acordo com a região onde são fabricados, Wen *et al.* (2021) analisaram a ecologia fúngica de linguiças oriundas de cinco diferentes localidades da China através do sequenciamento de amplicons de alto rendimento, utilizando espaçador transcrito interno (ITS) como marcador a fim de relacionar os fungos com os compostos voláteis presentes nas amostras (Quadro 2). Foram detectados um total de 272 espécies de fungos nos embutidos cárneos fermentados sendo que *Candida zeylanoides*, *D. hansenii*, *Trichosporon asahii*, *Pichia kudriavzevii*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus pseudoglaucus* foram as mais representativas. Observou-se que a prevalência dos fungos variou conforme a região produtora do embutido cárneo fermentado. *C. zeylanoides* foi detectado em maior abundância relativa em linguiças da cidade Daqing (DQ), *D. hansenii* foi a espécie predominante na linguiça de Harbin (HG), *T. asahii* foi a espécie predominante na linguiça de Mudanjiang (MDJ) enquanto que *P. kudriavzevii* foi detectado em maior abundância relativa na linguiça MDJ. Já *Alternaria alternata* e *Aspergillus pseudoglaucus* prevaleceram em todas as amostras, entretanto a da região Suihua (SH) apresentou maior abundância de *Alternaria alternata* enquanto que *A. pseudoglaucus* foi mais abundante na linguiça MDJ. Ao considerar que as características físico químicas e as formulações dos embutidos cárneos fermentados artesanais se diferenciam de região para região, os fungos encontrados podem ser provenientes de diversas fontes, como da própria carne crua, das especiarias utilizadas, das instalações onde ocorre o processamento ou do próprio ambiente onde ocorre a fermentação. Além das identificação dos fungos, o estudo constatou que 8 espécies (*D. hansenii*, *C. zeylanoides*, *T. asahii*, *A. pseudoglaucus*, *A. sydowii*, *P. expansum*, *A. alternata* e *A. tenuissima*) estão relacionados com os compostos voláteis presentes, sendo que o *D. hansenii* pode ser considerado o fungo funcional central porque foi correlacionado com a formação de 8 diferentes compostos voláteis (hexanal, 1-octen-3-ol, acetato de etila, hexanoato de metila, etil hexanoato, metil butirato, metil heptanoato e etil heptanoato).

Outro estudo realizado pelos mesmos autores analisou as propriedades tecnológicas e o potencial de sabor de leveduras em linguiças fermentadas artesanais de diferentes regiões da China (WEN *et al.*, 2022) (Quadro 2). As cepas foram identificadas e a tipagem foi realizada utilizando métodos genotípicos dependentes de cultivo. Como resultado foram identificadas 46 cepas, sendo que 34 linhagens foram selecionadas para mais estudos. O estudo identificou um total de 56 compostos voláteis e, levando em consideração que o sabor não está relacionado somente com o teor de compostos voláteis mas também com os valores limiares

destes compostos, a cepa *D. hansenii* SH4 foi eleita como a melhor produtora de sabor, uma vez que foi relacionada com os maiores valores de atividade de odor (OAV, do inglês *Odour Activity Value*) associados às características sensoriais desejadas em linguiças fermentadas, como 3-metil-butanal, butirato de etila, isovalerato de etila, hexanoato de etila, heptanoato de etila, caprilato de etila, 2-metilbutirato de etila e 3-fenilpropionato de etila. Em paralelo com estes resultados, estudos mais antigos também destacaram *D. hansenii* como grande responsável pelas características sensoriais de embutidos cárneos fermentados. Cano-García, Flores, Belloch (2013) isolaram *D. hansenii* de linguiças fermentadas naturalmente a fim de estudar a relação de tal microrganismo com os compostos voláteis. O estudo foi realizado utilizando técnicas moleculares cultivo dependente: as cepas foram isoladas em meio GPY (2% de glicose, 0,5% de peptona e 0,5% de extrato de levedura), as regiões ITS 1, 5.8S rRNA e ITS2 foram amplificadas por PCR e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose. Eles relataram que sete linhagens de *D. hansenii* produziram diferenças no perfil sensorial aromático das linguiças, sendo que os principais compostos gerados foram compostos ésteres, ésteres etílicos e metílicos, enxofre, álcoois, aldeídos e cetonas. *D. hansenii* têm papel fundamental para o sabor dos embutidos cárneos fermentados fabricados na China, uma vez que os estudos detectaram a sua relação direta com a produção de compostos voláteis característicos nas linguiças dessa região. Dado a importância dos atributos sensoriais regionais e a necessidade de padronização de alimentos fermentados artesanais, o uso de *D. hansenii* como cultura *starter* é bastante interessante, pois auxilia na manutenção do sabor e aroma desejado e possibilita que o processo fermentativo seja padronizado, conservando as características do produto preparado artesanalmente.

Tendo em vista que os compostos responsáveis pelas características sensoriais dos embutidos cárneos se formam ao longo do processo de fermentação e maturação, e que a ecologia de tais produtos se modifica no decorrer deste período, Zwirzitz *et al.* (2021), em uma pesquisa recente, estudaram quatro diferentes tipos de embutidos cárneos fermentados ao longo do período de maturação a fim de compreender as mudanças que ocorrem na ecologia microbiana durante este processo (Quadro 2). As amostras foram coletadas de duas diferentes instalações localizadas na Áustria no período de novembro de 2018 (amostras A.1, A.2) e abril de 2019 (amostras B.1 e B.2). Os autores utilizaram os genes 16S rRNA para bactérias e ITS2 para fungos e realizaram o sequenciamento genético completo na plataforma MiSeq Illumina. Foram encontrados uma média de 26.163 sequências bacterianas e 35.494 sequências fúngicas. Como resultado, foi observado que em todas as amostras analisadas

houve um decréscimo da comunidade bacteriana ao longo da maturação enquanto a comunidade fúngica se manteve estável ou até mesmo aumentou. O microbioma central dos embutidos foi definido através da comparação entre as comunidades microbianas das diferentes amostras, ou seja, verificou-se quais sequências únicas (ASVs, do inglês *amplicon sequence variants*) foi encontrado em todos os embutidos e quais foram exclusivos de determinada amostra. Constatou-se como microbioma central as espécies *Alternaria alternata*, *Mycosphaerella tassiana*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida zeylanoides*, *Tausonia pullulans*, *Debaryomyces hansenii* e *Vishniacozyma victoriae*. É importante ressaltar que cada amostra obteve uma microbiota individual, sugerindo que a população fúngica é inerente a diferentes locais e formas de produção, entretanto, há espécies comuns a todos os tipos de embutidos. Além disso, os autores observaram que as maiores mudanças na comunidade microbiana ocorreu durante os primeiros dias de maturação, sendo que, de modo geral, a comunidade fúngica se mostrou mais heterogênea ao longo do período de maturação frente a comunidade bacteriana, que revelou uma tendência a se tornar homogênea com o decorrer do tempo. Essa diversidade fúngica pode ser atribuída ao fato de que grande parte dos fungos são xerofílicos e, por isso, são capazes de adaptar-se bem à diminuição de *a_w* decorrente do processo de maturação (LÓPEZ DÍAZ *et al.*, 2002). De modo geral, as espécies mais relatadas foram *Calophoma sandfjordica*, *Itersonilia perplexans*, *Alternaria alternata* e *Debaryomyces hansenii*, sendo que *Calophoma sandfjordica* foi encontrada em maior concentração nas amostras “B” enquanto *Alternaria alternata* predominou nas amostras “A”. É importante ressaltar que a espécie *Alternaria alternata* foi detectada em diversos estudos com derivados cárneos, entretanto é um patógeno comum em plantas (DORN-IN *et al.*, 2013; WEN *et al.*, 2021). Há relatos de que este microrganismo produz metabólitos que afetam negativamente a microbiota intestinal dos seres humanos e que é capaz de produzir uma série de proteínas alergênicas, capazes de potencializar problemas respiratórios (CRUDO *et al.*, 2021; Gabriel *et al.*, 2016). Já *Debaryomyces hansenii* foi identificada de forma abundante em todos os embutidos cárneos fermentados analisados e manteve uma taxa crescente de multiplicação desde o início do processo até o período médio de maturação, seguido por um decréscimo ao fim do período. Observou que *Itersonilia perplexans* se fez presente em maior abundância nos primeiros dias de maturação, diminuiu no período médio e aumentou novamente ao fim da maturação. Enquanto isso, *Candida zeylanoides* diminuiu ao longo da maturação, ao contrário de *Mycosphaerella tassiana*, que aumentou durante todo o processo. Os resultados observados permitem inferir que a comunidade fúngica foi mais estável e mais

heterogênea frente a comunidade bacteriana e que o papel dos fungos no processo de embutidos cárneos fermentados ainda é subestimado (ZWIRZITZ *et al.*, 2021). Tal observação é pertinente uma vez que os fungos ainda são pouco estudados através da metataxonômica, o que deixa uma lacuna para a compreensão completa da ecologia microbiana de embutidos cárneos fermentados.

Os estudos utilizando a abordagem metataxonômica para a identificação da comunidade microbiana de alimentos fermentados estão avançando, entretanto essa metodologia ainda é pouco utilizada. Diversos fatores, tais como o alto custo e a falta de recursos em bioinformática, colaboraram para que a popularização das técnicas de sequenciamento genético ainda sejam pouco utilizadas (CUNHA, 2016). Todavia, os métodos moleculares são uma alternativa extremamente importante para a caracterização micobiana de diferentes tipos de produtos artesanais, incluindo dos embutidos cárneos fermentados, uma vez que a identificação dos fungos nestes produtos possibilita a compreensão da funcionalidade de tais microrganismos na matriz alimentícia (FRANCIOSA *et al.*, 2018). É importante ressaltar que a abordagem metataxonômica vem sendo utilizada com mais frequência para a identificação bacteriana em embutidos cárneos fermentados no mundo inteiro (POŁKA *et al.*, 2015; GREPPI *et al.*, 2015; FERROCINO *et al.*, 2017; GIELLO *et al.*, 2018; SANTIYANO NT *et al.*, 2019; SETTANNI *et al.*, 2020), enquanto que os bolores e leveduras ainda são vistos como papel secundário (ZWIRZITZ *et al.*, 2021). Contudo, estudos recentes estão revelando que os fungos exercem funções tão importantes quanto as bactérias ao longo de todo o processo de fermentação e maturação de embutidos cárneos fermentados artesanais. Notou-se que *Debaryomyces hansenii* e *Candida zeylanoides* foram espécies recorrentes na maioria dos estudos analisados, cuja relação com as propriedades organolépticas são bastante relevantes, podendo assim, serem consideradas cepas com potencial para serem utilizadas como *culturas starters* (DEGENHARDT *et al.*, 2021; WEN *et al.*, 2021; ZWIRZITZ *et al.*, 2021; WEN *et al.*, 2022).

4. CONCLUSÃO

A partir da revisão realizada observou-se que a comunidade fúngica tem um papel fundamental durante todo o processo de fermentação e maturação de embutidos cárneos fermentados artesanais. Ainda que a importância de bolores e levedura seja subestimada frente à relevância das bactérias, estudos comprovam que tais microrganismos influenciam diretamente as características organolépticas dos embutidos, uma vez que estão relacionados com a produção de diversos compostos voláteis que colaboram significativamente para a melhoria dos atributos sensoriais característicos de linguiças e salames artesanais. A levedura *Debaryomyces hansenii* pode ser considerada como um microrganismo em potencial para ser utilizada como cultura *starter*, uma vez que se fez presente em mais de uma região e foi relacionada com a produção de diversos compostos voláteis responsáveis pela produção de sabor e odor de embutidos cárneos fermentados artesanais.

A abordagem metataxômica se mostrou uma alternativa extremamente válida e de grande importância para o conhecimento da microbiota completa de embutidos cárneos fermentados artesanais. Tal abordagem permite compreender a inter-relação existente entre a comunidade fúngica autóctone deste tipo de produto, as modificações que ocorrem na população fúngica no decorrer do processo fermentativo, a influência que tais microrganismos têm sobre as características sensoriais destes alimentos e também sobre o potencial que certas cepas apresentam para produção de micotoxinas quando submetidas a determinadas condições de temperatura, aw, pH e nutrientes. Desta forma, o estudo e aplicação deste tipo de análise microbiológica é muito vantajoso quando comparado aos métodos da microbiologia clássica e tem um papel fundamental, tanto para o controle da segurança destes alimentos, quanto para o desenvolvimento e aprimoramento das características sensoriais. Entretanto, devido ao alto custo deste tipo de análise e a necessidade de conhecimento avançado em bioinformática, a aplicação deste tipo de metodologia ainda é bastante limitada. Em decorrência desses fatores, acredita-se que as análises metataxonômicas seguirão restritas a estudos teóricos pelos próximos anos para que em somente em um futuro distante sejam aplicadas em larga escala e se tornem uma realidade dentro dos laboratórios de pequenas e grandes indústrias de alimentos.

É importante ressaltar ainda que, estudos e experimentos futuros, se fazem necessários a fim de entender a totalidade da ecologia de embutidos cárneos fermentados artesanais, com

o intuito de formular culturas *starters* que conservem a individualidade característica de cada região mas que permitam que o processo fermentativo ocorra de forma controlada e segura.

5. REFERÊNCIAS

ANGÉLICO, C. L. **Aplicação do agente biológico *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries “Cladosporin” como bioprotetor da qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 320 f. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Lavras). Lavras. 2012.

ANGULO, M. *et al.* Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 18, v. 104, p. 7689– 7699, 2020.

ASEFA, D. T. *et al.* Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 131 - 135, 2010.

BACKES, A. M. **Desenvolvimento de produto cárneo fermentado adicionado de óleo de canola**. 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Maria). Santa Maria. 2011.

BARROS, C. **Descomplicando as Boas Práticas de Fabricação - BPF**. MAI. 2019. Disponível em: <https://www.paripassu.com.br/blog/descomplicando-as-boas-praticas-de-fabricacao-bpf> . Acesso em 22 nov. 2020.

BATTILANI, P. *et al.* Influence of abiotic parameters on ochratoxin A production by a *Penicillium nordicum* strain in dry-cured meat model systems. **Food Control**, v. 21, n.12, p. 1739–1744, 2010.

BERNALDÉZ, V. *et al.* Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchich´ on”. **Food Control**, v. 32, p. 69–76, 2013.

BIASE, V. **Tecnologia de produtos cárneos fermentados**: parte I. 2021. Florianópolis. 13p. Notas de aula.

BIASE, V. **Tecnologia de produtos cárneos fermentados**: parte II. 2021. Florianópolis. 15p. Notas de aula.

BRASIL. Decreto nº 9013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 30 mar 2017. Seção 1.

BRASIL. Decreto nº 9918 de 18 de julho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 19 jul 2019. Seção 1, p. 4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000. Aprovar os Regulamento Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salaminho tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Lingüiça Colonial e Pepperoni. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 3 ago. 2000. Seção 1, p 15.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2018. Ficam estabelecidos como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, indexado ao International Standard Book Number (ISBN) sob o número 978-85-7991-111-8, disponível no sítio eletrônico do MAPA, para realização de ensaios em amostras de produtos de origem animal, oriundas dos programas e controles oficiais do MAPA, cuja adoção é compulsória pelos laboratórios integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 jul 2018. Seção 1, p.9.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em

carnes e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar 2019. Seção 1 , p. 194.

CANEL, R. S. *et al.* Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Córdoba). **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, p. 81 - 86, 2013.

CANO-GARCÍA, L.; FLORES, M.; BELLOCH C. Molecular characterization and aromatic potential of *Debaryomyces hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages. **Food Research International**, v. 54, p. 42-49, 2013.

CARDOSO, M. F. **Identificação e quantificação de fungos em queijo colonial utilizando a região ITS1 do gene ITS**. 2021. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2021.

CASABURI, A. *et al.* Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. **Meat Science**, v. 76, p. 295 - 307, 2007.

CASARIL, K. B. P. B. *et al.* Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 7, n.2, p. 75 - 85, 2017.

CASTILHO, N. P. A. **Avaliação de protocolos alternativos para enumeração de culturas starter e bactérias lácticas utilizadas na produção de salame**. 2014. 80 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2014.

CENCE, K. **Avaliação do efeito das enzimas B-1,3-glucanase e quitinase como alternativa no controle de desenvolvimento de fungos de superfície de salame**. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim. 2016.

CRISTOFF, A. P. **Utilizando marcadores moleculares para a identificação de microrganismos**. Florianópolis: Neoprospecta, 2016. Ebook.

CRUDO, F. *et al.* In vitro interactions of alternaria mycotoxins, an emerging class of food contaminants, with the gut microbiota: a bidirectional relationship. **Arch Toxicol**, n. 7, v. 95, p.: 2533– 2549, 2021.

CRUXEN, C. E. S. *et al.* Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: Application potential, safety aspects, and emerging technologies. **Food Research International**, v. 122, p.371 - 782, 2019.

CUNHA, P. **Métodos de tipagem microbiológica para o rastreamento e controle de surtos**. Florianópolis: Neoprospecta, 2016. E-book

DAMODARAN, S; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R **Química de alimentos de Fennema**. 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2010, 890p.

DEGENHARDT, R. *et al.* Detection of Enteric Viruses and Core Microbiome Analysis in Artisanal Colonial Salami-Type Dry-Fermented Sausages from Santa Catarina, Brazil. **Foods**, v. 10, p. 1957.

DELGADO, J. *et al.* Influence of ochratoxin A on adaptation of *Penicillium nordicum* on a NaCl-rich dry-cured hambased medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.. 272, p. 22–28, 2018.

DELGADO, J. *et al.* Influence of an industrial dry-fermented sausage processing on ochratoxin A production by *Penicillium nordicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 339, p.109916, 2021.

DORN-IN, S. *et al.* PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products. **International Journal of Food Microbiology**, n. 1, v. 162, p. 71– 81, 2013.

FERROCINO, I. *et al.* Shotgun Metagenomics and Volatilome Profile of the Microbiota of Fermented Sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 3, 2017.

FRANCIOSA, I. *et al.* Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, p. 26-32, 2018.

Gabriel, M. F. *et al.* *Alternaria alternata* allergens: markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. **Environment International**, v. 89:90, p. 71-80, 2016.

GIELLO, M. *et al.* Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 72, p. 1–15, 2018.

GREPPI, A. *et al.* Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 212, p. 67–75, 2015.

GUEVARA, Y. E. D. **Inclusão de carne de corvina (*Micropogonias furnieri*) em embutido do tipo salame italiano**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 2014.

HANGUI, S. A. R. *et al.* Análise microbiológica da carne bovina moída comercializada na cidade de Anápolis, Goiás, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 12, p. 30-38, 2015.

HANSEN, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p119-131, 2002.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, p. 1-8, 2016.

JAIN, U. *et al.* *Debaryomyces* is enriched in Crohn's disease intestinal tissue and impairs healing in mice. **Science**, v. 371, p.1154 - 1159, 2021.

KAZOU, M. et al. Zooming into the microbiota of home-made and industrial kefir produced in Greece using classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses. **Frontiers in Microbiology**, v 12, 2021.

KERGOURLAY, G. et al. Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 31-39, 2015.

KOCIC-TANACKOV, S. et al. Growth control of molds isolated from smoked fermented sausages using basil and caraway essential oils, in vitro and in vivo. **LWT - Food Science and Technology**, v. 123, p. 109095, 2020.

LETOY, F. et al. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. **Trends in Food Science & Technology**, v.31, n.2 / 3, p. 130-137, 2013.

LI, R. **Modification and development of probiotic strains *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG**. 2021. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - University of Helsinki. Helsinki. 2021.

LIPSKI, T. S. **Avaliação do processo fermentativo de salame tipo italiano com a adição de diferentes doses de açúcares**. 2017. 78f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão. 2017.

LOPEZ-CANOVA, L. et al. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. **Analytical Biochemistry**, v. 573, p. 17-29, 2019.

LÓPEZ DÍAZ, T. M. et al. Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. **Food Microbiology**, v. 19, n.1, p. 1-7, 2002.

LUDEMANN, V. Toxicological Assessment of *Penicillium nalgiovense* Strains for Use as Starter Cultures in the Manufacture of Dry Fermented Sausages. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 8, p. 1666–1670, 2009.

MAGRO, G. R.; KLEIN, C. S. **Comunicado Técnico - Qualidade microbiológica de Salames tipo colonial comercializados na cidade de Concórdia – SC: análise de *Salmonella*, coliformes totais e termotolerantes.** Concórdia: EMBRAPA, 2006, 5p.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, 3:31, 2015.

MARTINS, R. **Dossiê técnico - Produção de Embutidos Crus-Curados (Salame).** Rio de Janeiro: REDETEC, 2006, 24p.

MERLA, C. *et al.* Monitoring of ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi in traditional salami manufactured in Northern Italy. **Mycotoxin Research**, v. 34, p. 107 - 116, 2018.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet.** Washington, DC: The National Academies Press., 2007.

OAKLEY, B. B.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; MOLINA, M. 12. Molecular Typing and Differentiation. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** American Public Health Association, 2015. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.2105/mbef.0222.017>

OLIVEIRA, G. L. **Utilização de kefir como cultura iniciadora na elaboração de salame.** 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação. Rio Pomba. 2020.

OLIVEIRA, J. S. **O mercado de produtos fermentados artesanais: estudo de caso de uma cervejaria e uma charcutaria pioneira em Florianópolis.** 2019. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Gastronomia) - Instituto Federal de Santa Catarina - 2019.

PARUSSOLO, G. *et al.* Fungi in air, raw materials and surface of dry fermented sausage produced in Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 190-198, 2019.

PENNACCHI, C. *et al.* Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1919 - 1928, 2008.

PEREIRA, J. G.; BARCELLOS, V. C.; BERSOT, L. S. Disseminação de Salmonella no processamento industrial em pequena escala de salame artesanal. **Archives of Veterinary Science**, v.24, n.1, p.01-09, 2019

PERRONE *et al.* Insights into existing and future fungal and mycotoxin contamination of cured meats. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 20-27, 2019.

POŁKA, J. *et al.* Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. **Food Microbiology**, v. 46, p. 342–356, 2015.

PRISTA, C. *et al.* The Halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. **Yeast**, n.10, v 33, p.523 - 533, 2016.

RANTSIOU, K. *et al.* Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1977–1986, 2005.

REIS, R. M. **Qualidade de carne bovina moída in natura comercializada em Manaus, AM.** 2019. 60f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2019.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. **International Journal Food Microbiology**, v. 178, p. 113–119, 2014.

RODRÍGUEZ, A. *et al.* Relationship between ecophysiological factors, growth and ochratoxin A contamination of drycured sausage based matrices. **International Journal Food Microbiology**, v 194, p. 71–77, 2015.

RYU, D.; WOLF-HALL, C. Yeasts and Molds. In: SALFINGER, I.; TORTORELLO, M. L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. [S.I]: Apha Press, 2015. Cap. 21. p. 277-286

SANTA, O. R. D. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo italiano**. 2008. 147f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

SANTAMARIA, M. *et al.* Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics. **Briefings in bioinformatics**, v. 13, p. 682 - 695, 2012.

SANTANA, F. E. O. *et al.* Micro-organismos em linguiça frescal de frango comercializadas na forma a granel: um fator de risco à saúde pública. *In: I CONGRESSO INTERNACIONAL DO MEIO AMBIENTE E SOCIEDADE E III CONGRESSO INTERNACIONAL DA DIVERSIDADE DO SEMIÁRIDO*, 2019, Campina Grande. **Anais do evento**. Campina Grande: Editora Realize, 20 nov. 2019.

SANTIYANONT, P. *et al.* Dynamics of biogenic amines and bacterial communities in a Thai fermented pork product Nham. **Food Research International**, v. 119, p. 110 - 118, 2019.

SCHMIDT-HEYDT, M. *et al.* The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. **Food Microbiology**, v. 29, p. 233–241, 2012.

SCHMITT, B. **Avaliação sensorial do uso de diferentes culturas iniciadoras na produção de salame tipo italiano do frigorífico Antônio Carlos**. 2017. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2017.

SETTANNI, L. *et al.* Evolution of indigenous starter microorganisms and physicochemical parameters in spontaneously fermented beef, horse, wild boar and pork salamis produced under controlled conditions. **Food Microbiology**, v. 87, p. 103385, 2020.

SILVA *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017, 40 p.

SONJAK S, *et al.* The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. **Food microbiol**, v. 30, p. 1 - 4, 2010.

TRINDADE, A. C. **Propriedades técnico-funcionais de diferentes misturas de proteínas cárneas e concentrado proteico de soro de leite**. 2015. 105f. Dissertação (Magister Scientiae em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2015.

TURCHETTO-ZELOT, A. C. *et al.* **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017, 180p. Ebook.

VILA, G. *et al.* Surface mycobiota of home-made dry cured sausages from the main producing regions of Argentina and morphological and biochemical characterization of *Penicillium nalgiovense* populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 309, p.108312, 2019.

WEN, R. *et al.* The potential correlations between the fungal communities and volatile compounds of traditional dry sausages from Northeast China. **Food Microbiology**, v. 98, p. 103787, 2021.

WEN, R. *et al.* Technological properties and flavour formation potential of yeast strains isolated from traditional dry fermented sausages in Northeast China. **LWT**, v. 154, p.112853, 2022.

ZEUTHEN, P. A historical perspective of meat fermentation. In: TOLDRÁ, F. *et al.* **Handbook of fermented meat and poultry**. 1. ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2007, p. 3-6.

ZWIRZITZ, B. *et al.* Autochthonous fungi are central components in microbial community structure in raw fermented sausages. **Microbiol Technology**, p. 1-12, 2021.