Arte sobre fotografia de Raquel de Oliveira
27 A 29 DE MAIO DE 2020
BENTO GONÇALVES • RS
7º Simpósio de Segurança Alimentar
INOVAÇÃO COM SUSTENTABILIDADE

MÉTODOS GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA EM EMBUTIDOS CÁRNEOS

B. M. Maran[1], S. Verruck[2]

1- Departamento de Engenharia Química e de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – CEP: 88034-001 – Florianópolis – SS – Brasil – e-mail: (brunammaran@gmail.com)

2-Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – CEP: 88034-001 – Florianópolis – SS – Brasil – e-mail: (silvani.verruck@ufsc.br)

RESUMO – Os embutidos cárneos fermentados artesanais, como linguiças coloniais, têm uma longa tradição de consumo no sul do Brasil. Esse tipo de produto possui uma microbiota específica, típica da região em que são produzidos. Portanto, para proteger o aspecto tradicional desses produtos, é essencial entender a ecologia microbiana durante a fermentação, estudando as mudanças dinâmicas que ocorrem além de selecionar culturas *starters* autóctones que podem ser usadas na produção. Neste sentido, as técnicas de sequenciamento completo ou parcial do genoma microbiano representam uma mudança na maneira como os produtos artesanais podem ser produzidos. De fato, a aplicação da metataxonomia e da metagenômica permitirá uma compreensão detalhada da ecologia microbiana presente nestes produtos. Sendo assim, o conhecimento aprofundado dos mecanismos por trás dos processos biológicos aumentará o controle e a modulação da fermentação do embutido para obter produtos com as propriedades organolépticas desejadas, além de impulsionar o setor.

ABSTRACT – Artisanal fermented sausages, such as colonial sausages, have a long tradition of consumption in southern Brazil. This type of product has a specific microbiota, typical of the region in which they are produced. Therefore, to protect the traditional aspect of these products, it is essential to understand the microbial ecology during fermentation, studying the dynamic changes that occur in addition to selecting native starter cultures that can be used in production. In this sense, the techniques of complete or partial sequencing of the microbial genome represent a change in the way artisanal products can be produced. In fact, the application of metataxonomy and metagenomics will allow a detailed understanding of the microbial ecology present in these products. Thus, the in-depth knowledge of the mechanisms behind biological processes will increase the control and modulation of the fermentation of the sausage to obtain products with the desired organoleptic properties, in addition to stimulating the sector.

PALAVRAS-CHAVE: produto artesanal; genômica; metataxonômica; metagenômica.

KEYWORDS: artisanal product; genomics; metataxonomic; metagenomics.

1. INTRODUÇÃO

Embutidos cárneos são produtos produzidos a partir de carnes ou órgãos comestíveis, podendo ser curados, condimentados, cozidos, defumados e dessecados, envolvido por uma tripa, sendo que esta pode ser de origem natural ou artificial (Brasil, 2017). No sul do Brasil, devido à forte colonização italiana e alemã e sua influência para a cultura da região, os produtos embutidos, tais como linguiças coloniais, possuem uma forte aceitação, além de serem tradicionalmente elaborados de maneira artesanal nos próprios domicílios ou em pequenas indústrias, e então, comercializados em supermercados, feiras ou bancas de produtos coloniais (Magro & Klein, 2006).

Conforme o Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019 produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal são produtos elaborados com predominância de matérias primas de origem animal oriundas de produção própria ou de origem determinada, que passam por processo de produção predominantemente manual submetido ao controle de inspeção oficial, que mantém a singularidade e suas características tradicionais, culturais ou regionais do produto (Brasil, 2019). Neste sentido, o processo de produção de embutidos fermentados compreende a moagem da carne *in natura* com adição de gordura, sal, agentes de cura e temperos. São as interações entre os processos químicos, físicos e microbiológicos que determinam a qualidade, cor, textura e sabor do produto final (Gottardo et al., 2011). Tradicionalmente, o produto embutido fermentado artesanal não consegue apresentar constância em seu padrão de qualidade em diferentes locais de produção, isso porque depende dos microrganismos provenientes da microbiota presente nas matérias primas, nos equipamentos e instalações para que ocorra a fermentação (Roselino, 2016).

No entanto, o uso de culturas *starters* tornou-se cada vez mais necessário, garantindo assim, a segurança microbiana e padronização das propriedades do produto como a cor, sabor e consistência (Cocolin et al., 2001). Portanto, conhecer a composição da microbiota naturalmente presente em embutidos fermentados artesanais torna-se uma necessidade, a fim de desenvolver novas culturas *starters* específicas que poderão ser usadas em produtos artesanais sem que estes percam suas características tradicionais. Uma das ferramentas mais avançadas para identificação e caracterização da microbiota presente em produtos artesanais é o sequenciamento genético de amplo espectro dos microrganismos.

2. MÉTODOS GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

O estudo da composição microbiana de embutidos fermentados já foi realizado por métodos tradicionais de contagem de bactérias em placas, isolamento e identificação bioquímica dos microrganismos. Contudo, sabe-se que somente microrganismos facilmente cultiváveis podem ser detectados, enquanto os que necessitam de meios mais complexos ou que se encontram injuriados não são possíveis de se detectar (Rantsiout et al., 2005). No entanto, com o desenvolvimento da microbiologia molecular e a descoberta de que o DNA carrega informações hereditárias, indicando que todas as propriedades dos microrganismos estão criptografadas no genoma (Mardanov et al., 2018), tornou-se possível o uso de métodos moleculares para identificação dos microrganismos presentes em alimentos, entre estes os produtos fermentados (Fransiosa et al., 2018).

Os métodos de tipagem genotípica, por exemplo, avaliam a variação dos genomas dos microrganismos em relação a sua composição, estrutura ou sequência específica de nucleotídeos. Um exemplo destes métodos é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) onde o DNA bacteriano é clivado por uma enzima de restrição e então seus fragmentos são separados por tamanhos através da eletroforese para depois serem identificados. Porém, este tipo de análise é aplicável somente em estudos locais e pequenos com variabilidade genética presumidamente limitada (Cunha, 2016). Com o intuito de solucionar este problema, surgiram os métodos baseados em sequenciamento de DNA, os quais possuem a vantagem de serem armazenados em bancos de dados on-line e compartilhados entre laboratórios e pesquisadores (Cunha, 2016).

O sequenciamento completo do genoma, do inglês *Whole genome sequence* (WGS), é um termo utilizado para descrever o sequenciamento de todo o genoma de um organismo e é diferenciado em três gerações conforme a Tabela 1. O método desenvolvido por Sanger é conhecido como sequenciamento de primeira geração. Por este método faz-se o sequenciamento de uma cadeia simples de DNA que serve de molde para gerar a outra metade da dupla hélice. No entanto mesmo sofrendo alterações ao longo do tempo, ele ainda continua sendo um método trabalhoso, caro e com comprimento de leitura muito curto (Oakley et al., 2015, Santos et al., 2013).

Tabela 1 - Visão generalizada de algumas das tecnologias de sequenciamento genético disponíveis comercialmente.

Geração	Companhia	Plataforma	Método de preparação	Química	Precisão (%)
Primeira	ABI	3700/3730		Sanger	100
Segunda	Roche	454-Flx Titanium	emPCR	Pyro	99,5
		454 GS junior	emPCR	Pyro	99,5
	Ilumina-Solexa	Hiseq 2000	CBA	RDT	-
		MiSeq	CBA	RDT	>98,5
	Life Technologies	SOLid	emPCR	OPL	99
		Ion Torrent	emPCR	Pyro (pH)	99
		Ion Proton	emPCR	Pyro (pH)	99
Terceira	Pacific BioScience			Single Molecule	86

CBA : clonal bridge amplification; emPCR: emulsion PCR; OPL: oligonucleotide probe ligation; Pyro: pirosequencing; RDT: reverse dye terminators
Fonte: Adaptado de Oakley et al. (2015).

Investimentos públicos e privados levaram a criação de tecnologias de sequenciamento de segunda geração ou sequenciamento de próxima geração (NGS) (Tabela 1), as máquinas de sequenciamento 454 são uma mudança de paradigmas já que permitem a paralelização em massa das reações de sequenciamento, aumentando a quantidade de DNA que pode ser sequenciado (Heather & Chain, 2016). Após o sucesso da plataforma 454, outras empresas de sequenciamento desenvolveram suas próprias metodologias. A plataforma Ilumina-Solexa, assim como a de Sanger, realiza síntese pela enzima DNA polimerase, mas a clonagem é realizada pelo processo de PCR de fase sólida. O processo é semelhante no sistema SOLiD que difere do Solexa somente no fato de que a reação de sequenciamento é catalisada agora pela DNA ligase (Santos et al., 2013). Já a plataforma Ion Torrent, conhecida como sequenciamento pós-luz, utiliza uma abordagem indireta para sequenciamento de DNA e microchips como sensores de detecção do resultado. Contudo, mesmo a plataforma Ion Torrent sendo a última da segunda geração, nos últimos anos a Ilumina-Solexa é a plataforma mais utilizada e mais bem sucedida entre as plataformas de segunda geração (Heather & Chain, 2016).

A terceira geração de sequenciamento difere das demais gerações por sequenciar moléculas únicas sem a necessidade de amplificação, simplificando os procedimentos e reduzindo os custos. A plataforma Pacific BioScience é uma das técnicas desta geração e é capaz ler em tempo real pequenos genomas como bactérias, plasmídeos e fagos. Outro método é utilizado na plataforma DNA Oxford Nanopore e trabalha com nanoporos biológicos sendo hoje considerada uma das tecnologias mais promissoras para o sequenciamento de terceira geração (Wasfi et al., 2018).

Além do WGS, existem outras abordagens de tipagem por sequenciamento como a Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Loci (MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) que analisa as sequencias de fragmentos internos de vários genes de referência, geralmente sete, os quais são codificadores de proteínas

essenciais para a manutenção da função celular básica e estáveis com relação à presença de mutações genéticas (Cunha, 2016). Este sequenciamento de fragmentos internos de cada gene analisa entre 400 a 500 pares de base de 6 a 10 genes de referência e permite a obtenção de um perfil, denominado alelo, para cada gene analisado, baseado na característica sequencial de nucleotídeos (Oakley et al., 2015). Cada variação de sequência de nucleotídeos encontrada é considerada um alelo distinto e o conjunto destes é denominado de *sequence type* (ST) (Cunha, 2016). Os resultados do MLST podem apresentar diferentes expressões fenotípicas em termos de resistência aos antimicrobianos, virulência e patogênese. As análises por MLST podem também contribuir para elucidar a ocorrência de recombinações e de espécies críticas intraespecíficas. Sequências alélicas e perfis ST obtidos são compartilhados em bancos de dados on-line o que permite a padronização e posteriormente comparação dos dados obtidos com outros estudos (Cunha, 2016; Santos, 2019).

No entanto, a falta de diversidade de genomas completos bem como a presença de espécies recentemente emergidas, pode produzir resultados de MLST muito limitados em poder discriminatório onde nem todas as bactérias poderiam ser cultivadas com eficiência (Perez-Losada et al., 2013; Ederveen et al., 2019). Além do mais, há dificuldade de uso, falta de agilidade, acessibilidade limitada e o alto custo envolvido nas metodologias citadas anteriormente (Boccia et al., 2015). Desta forma, uma alternativa mais rápida, barata, de fácil uso e alto poder discriminatório para algumas espécies é a Tipagem por Sequenciamento de Único Locus, do inglês *Single-locus Sequence Typing* (SLST) a qual necessita de uma quantidade limitada de DNA a ser sequenciado, mas é imperativo selecionar sequencias genéticas que sejam altamente variáveis (Van Belkum et al., 2007; Boccia et al., 2015).

Para esta metodologia, existem várias regiões do gene que podem ser analisadas com grande variabilidade, no entanto, dependendo da espécie bacteriana a ser analisada utiliza-se inicialmente um marcador especifico, não sendo uma técnica padronizada. O gene 16S rDNA, devido sua presença em todos os procariotos, possuir tanto regiões conservadas como variáveis que evoluem em taxas diferentes e são essenciais na determinação de relações filogenéticas próximas e distantes, é considerado o padrão ouro para a taxonomia bacteriana (Cunha, 2016). A partir das metodologias citadas é possível identificar a microbiota de qualquer alimento, entre eles os embutidos fermentados artesanais. Desta forma, começam a emergir os estudos relacionados à metataxonômica e metagenômica de produtos cárneos fermentados (Fransiosa et al., 2018; Ferrocino et al., 2017).

A metataxonômica destaca-se por executar o sequenciamento para a identificação de toda a microbiota de uma amostra através de genes marcadores como o gene 16S para as bactérias e o gene 26S para leveduras. Esta metodologia apresenta resultados a nível taxonômico do filo até a espécie do microrganismo identificado, utilizando ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos como o GreenGene e RibosomalDatabase (Cesare, 2019; Fransiosa et al., 2018). Por outro lado, a metagenômica é uma abordagem que caracteriza o metagenoma e o microbioma sem necessitar de um único gene específico. Esta técnica realiza o sequenciamento tipo *shotgun*, que é o processo que rompe aleatoriamente longas moléculas de DNA e depois sequencia os fragmentos de DNA resultantes, vindos de locais diferentes da molécula original. Os dados deste sequenciamento fornecem informações sobre os organismos presentes e os genes funcionais na amostra (Cesare, 2019). Desta forma é possível entender a relação entre os microrganismos, suas atividades e funcionalidades no alimento (Fransiosa et al., 2018).

3. PERSPECTIVAS FUTURAS

No alimento, a composição e função da microbiota é essencial para a identificação de enzimas, vias metabólicas, mecanismos de ação e como elas podem operar sob condições específicas. Isso porque mudanças no produto devido a diferentes condições de maturação, presença de culturas *starters* e composição inicial da microbiota, podem alterar o repertório genético que impacta nas características sensoriais e na vida de prateleira deste. Além disso, com o conhecimento sobre os gêneros, espécies e cepas predominantes de amostras regionais, como no caso de embutidos cárneos artesanais, é possível desenvolver culturas *starters* próprias para aquele produto. Isso traria maior segurança microbiológica ao longo da produção artesanal, bem como poderia impulsionar o setor de produtos artesanais gerando mais uma fonte de renda para pequenos produtores.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (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 (Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília – DF.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento –MAPA (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 (decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília – DF.

De Cesare, A., (2019). Metagenomics to investigate the dynamics of microbial communities in poultry and poultry products. *Lohmann Tierzucht* 53(2).

Cocolin L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G.(2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology,* 67 (11), 5113–5121.

Cunha, P. (2016). *Métodos de tipagem microbiológica para o rastreamento e controle de surtos*. Neoprospecta.

Ederveen, T. H. A., Smits, J. P. H., Hajo, K., Schalkwijk, S. V., Kouwenhoven, T. A., Lukovac, S., Wels, M., Bogaard, E. H. V., Schalkwijk, J., Boekhorst, J., Zeeuwen, P. L. J. M., van Hijum, S. A. F. T. (2019). A generic workflow for Single Locus Sequence Typing (SLST) design and subspecies characterization of microbiota. *Scientific reports*. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56065-y

Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2018). Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International Journal of Food Microbiology*. 279, 26-32. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518301971

Ferrocino, I., Bellio, A., Giordano, M., Macori, G., Romano, A., Rantsiou, K., Decastelli, L., Cocolina, L. (2018). Shotgun Metagenomics and Volatilome Profile of the Microbiota of Fermented Sausages. *Appl Environ Microbiol* 84:e02120-17. https://doi.org/10.1128/AEM.02120-17.

Gottardo, E. T., Viana, C., Barcellos, V. C., Zanette, C. M., Bersot, L. S. (2011). Embutidos cárneos fermentados artesanais como veículos de micro-organismos patogênicos de importância para saúde pública. *Centro de Pesquisas e Proc de Alimentos – CEPPA*. v. 29, n. 1, p. 97-102. Disponível em: https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/22761

Heather, J. M., Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 107, 1-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003

Magro, G. R., & Klein, C. S. (2006). Qualidade Microbiológica de Salames tipo Colonial Comercializados na Cidade de Concordia-SC: análise de. Comunicado Técnico (CNPSA), 49.

Mardanov, A. V., Kadnikov, V. V., & Ravin, N. V. (2018). Metagenomics: A Paradigm Shift in Microbiology. In M. Nagarajan (Ed.), Metagenomics (First, pp. 1–13). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00001-X

Oakley, B. B., Gonzalez-Escalona, N., & Molina, M. (2015). 12. Molecular Typing and Differentiation. In Y. Salfinger & M. L. Tortorello (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Fifth, pp. 153–172). American Public Health Association. https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.017

Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 38-53. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009

Rantsiou K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G., Cocolin, L. (2005). Culture-Dependent and -Independent Methods To Investigate the Microbial Ecology of Italian Fermented Sausages. *Applied and Environmental Microbiology,* 71(4), 1977–1986.

Roselino, M. N. (2016). *Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas* (Tese de doutorado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

Santos, W. F., Oliveira, M. S., Romeiro, L. C. T. L., Alisson, M., Cunha, A. (2013). Sequenciamento de DNA: Métodos e Aplicações. *Health and Environment World Congress*. Porto, Portugal.

Santos, L. B. S. (2019). *Análise filogenética da espécie Trichosporon asahii por sequenciamento multilocus* (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Van Belkum1, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fussing V.,Green,J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Journal compilation* 13, 1-46.

Wasfi, A., Awwad, F., Ayesh, A. I. (2018). Graphene-based nanopore approaches for DNA sequencing: A literature review. *Biosensors and Bioelectrinics* 119, 191-203.