



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

GRAZIELE CRISTINA STRADIOTTO

**Micro-organismos esporulados na cadeia produtiva da gelatina: concentração,
caracterização e impacto na formulação de alimentos**

**Spore forming microorganisms in the gelatin chain production: concentration,
characterization and impact on food formulation**

**Campinas
2019**

GRAZIELE CRISTINA STRADIOTTO

**Micro-organismos esporulados na cadeia produtiva da gelatina: concentração,
caracterização e impacto na formulação de alimentos**

**Spore forming microorganisms in the gelatin chain production: concentration,
characterization and impact on food formulation**

*Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos/Instituto
da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Doutora em CIÊNCIAS DE
ALIMENTOS*

*Thesis presented to the Faculty of
Food Engineering of the University
of Campinas in a partial fulfillment of
the requirements for the degree of
Doctor Food Science*

Supervisor/Orientador: **PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA**

Campinas

2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant’Ana

Presidente

FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes

Membro

FCA/UNICAMP

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

Membro

IFRJ

Dra. Claudia Nakamura Horita

Membro

FEA/UNICAMP

Profa.Dra. Denise Rosane Perdomo Azeredo

Membro

IFRJ

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

St81m Stradiotto, Graziele Cristina, 1984-
Micro-organismos esporulados na cadeia produtiva da gelatina :
concentração, caracterização e impacto na formulação de alimentos / Graziele
Cristina Stradiotto. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Gelatina. 2. Colágeno. 3. Bactérias esporuladas. I. Sant'Ana, Anderson de
Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

*Dedico ao meus pais João e Maria Rita (in
memorian) pelo amor e apoio incondicional
em todas as etapas de minha vida e por me
incentivarem a lutar pelos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela presença contante em minha vida, por guiar meus passos nesta longa caminhada e por ter me dado forças para não desistir diante dos obstáculos.

À minha família: meu pai João que me apoiou em todos os momentos e decisões, com seu amor e fé acreditou em mim; à minha mãe Maria Rita (*in memoriam*) que sempre me incentivou a estudar e creio que de onde estiver está me guiando e me dando forças para prosseguir; às minhas irmãs Daiane e Mirele pelo apoio, companheirismo e incentivo sempre.

Ao professor Dr. Anderson de Souza Sant’Ana por me aceitar desde antes de fazer a prova, pelos ensinamentos, pela confiança, pela paciência e incentivo nestes 5 anos.

À todos os companheiros do laboratório LMQA-FEA, Verônica pelos ensinamentos e pela ajuda nos trabalhos iniciais; Ana Paula e Letícia por trabalharem comigo no trabalho experimental com os pães, o qual foi de muito aprendizado; em especial Alexandra que me ajudou muito em todas as análises da gelatina, pelo companheirismo, por me incentivar a não desistir quando tudo estava dando errado, serei eternamente grata.

Aos amigos que me apoiaram, que estiveram comigo, seja pessoalmente ou através da internet, obrigada por acreditarem em mim, pelas palavras de incentivo e força, pela companhia sempre que possível e quando precisava desabafar.

À todos os meus professores que sempre torceram por mim, desde o ensino fundamental, médio, técnico, graduação, mestrado e doutorado.

Ao apoio da Unicamp com a bolsa de assistência social, o intercamp e a assistência psicológica.

À empresa fornecedora das amostras de gelatina, a qual tive a oportunidade de visitar e conhecer todo o processo de produção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro (CNPq 165070/2014).

Gratidão a todos os envolvidos!!

RESUMO

A gelatina é uma proteína natural, extraída através da hidrólise parcial do colágeno presente em tecidos conjuntivos animais, amplamente utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica. Mesmo sendo obtida após um processamento sob condições drásticas de pH (ácido e alcalino) e tratamento térmico, a gelatina pode ainda apresentar contagens significativas de micro-organismos como enterobactérias e bactérias esporuladas. A utilização de lotes de gelatina contaminados por bactérias esporuladas na fabricação de alimentos pode levar à deterioração destes produtos ou à riscos à saúde dos consumidores. Desta forma, fica evidente a importância de garantir-se a qualidade e segurança microbiológica da gelatina. Por ser um dos principais produtores e exportadores mundiais de gelatina, é de suma importância que o Brasil gere dados científicos que orientem o desenvolvimento de ações visando a melhoria da qualidade deste ingrediente, visando-se principalmente melhorar a competitividade de nossa indústria em um cenário global. O presente trabalho teve por objetivos analisar a concentração de micro-organismos esporulados em diferentes etapas da cadeia produtiva da gelatina, a variação decimal das contagens entre cada uma das fases e a influência significativa destas, além da influência das estações do ano, caracterizar os isolados através de técnicas fenotípica e genotípica e avaliar qual impacto para a indústria farmacêutica e alimentícia. A maior redução decimal nas contagens para aeróbios mesófilos foi de $\gamma = -1,93$ (extrusão para o produto final), de aeróbios termófilos foi $\gamma = -2,17$ (tratamento alcalino para lavagem), de *Bacillus cereus* foi $\gamma = -3,07$ (tanque concentrado para esterilização) e anaeróbios mesófilos $\gamma = -1,08$ (tanque concentrado para esterilização). As etapas do processo e as estações do ano tiveram influência significativa sobre as contagens nos dois modelos estatísticos (ANOVA e PLS-DA). Foram identificadas espécies produtoras de gelatinases e toxinas (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*) e dentre os impactos que estas poderiam trazer para as indústrias produtoras e consumidoras pode-se citar: os prejuízos econômicos devido às perdas de produtos pela degradação enzimática e os danos ocasionados à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: gelatina, micro-organismos esporulados, colágeno

ABSTRACT

Gelatine is a natural protein, extracted through the partial hydrolysis of collagen present in animal connective tissues, widely used in the food and pharmaceutical industry. Even though it is obtained after processing under drastic conditions of pH (acid and alkaline) and heat treatment, the gelatin can still present significant counts of microorganisms such as enterobacteria and sporeforming bacteria. The use of gelatin batches contaminated by sporeforming bacteria in food manufacturing may lead to deterioration of these products or to the health risks to consumers. In this way, the importance of ensuring the microbiological quality and safety of gelatine is evident. Being one of the leading producers and exporters of gelatine in the world, it is of the utmost importance that Brazil manages scientific data that guide the development of actions aimed at improving the quality of this ingredient, aiming mainly to improve the competitiveness of our industry in a global scenario. The objective of the present work was to analyze the concentration of sporeforming microorganisms in different stages of the gelatin production chain, the decimal variation of the counts between each of the phases and their influence, besides the influence of the seasons, to characterize the isolates through phenotypic and genotypic techniques and to evaluate the impact for the pharmaceutical and food industry. The highest decimal reduction in the counts for mesophilic aerobes was $\gamma = -1.93$ (extrusion for the final product), of thermophilic aerobes was $\gamma = -2.17$ (alkaline treatment for washing), *Bacillus cereus* was $\gamma = -3.07$ (concentrated tank for sterilization) and mesophilic anaerobes $\gamma = -1.08$ (concentrated tank for sterilization). The process steps and the seasons of the year had significant influence on the counts in the two statistical models (ANOVA and PLS-DA). Species producing gelatinases and toxins (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*) have been identified and among the impacts that these could bring to the producing and consuming industries we can mention: the economic losses due to the losses of products due to the enzymatic degradation and the damages caused to the consumer health.

Keywords: gelatine, sporeforming microorganisms, collagen

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1	14
REVISÃO DE LITERATURA	14
Produção de gelatina no Brasil: Processamento e principais micro-organismos contaminantes	15
ABSTRACT	16
1.INTRODUÇÃO.....	18
1.1.Gelatina	18
2. O Processo de Fabricação e Qualidade e Segurança Microbiológica da Gelatina:	20
2.1. Matérias-Primas:	20
2.2. O Processamento da Gelatina	21
3.Micro-organismos Contaminantes da Gelatina:	25
3.1. Classificação e Características do gênero <i>Bacillus</i>	27
3.1.1. Características da espécie <i>Bacillus cereus</i>	28
3.1.2. Características da espécie <i>Bacillus licheniformis</i>	29
3.1.3. Características da espécie <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	30
3.2. Características do gênero <i>Clostridium</i>	31
3.3. Características de Coliformes	31
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2	38
Concentração e identificação molecular de micro-organismos esporulados isolados das etapas do processamento da gelatina	39
ABSTRACT	40
1.INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43

2.1. Coletas	43
2.2. Determinação da Ocorrência e Concentração de Micro-organismos Esporulados na Cadeia Produtiva da gelatina	44
2.2.1. Contagem e Isolamento de Aeróbios Mesófilos esporulados	45
2.2.2. Contagem e Isolamento de Aeróbios Termófilos esporulados	45
2.2.3. Contagem e Isolamento de <i>Bacillus cereus</i>	45
2.2.4. Contagem e Isolamento de Anaeróbios Mesófilos esporulados.....	46
2.3. Identificação dos Isolados por Sequenciamento de 16S rRNA	46
2.3.1. Extração de DNA	46
2.3.2. Amplificação do gene 16S e sequenciamento	46
2.3.3. Análise estatística.....	47
3. Resultados.....	47
3.1 Análise descritiva dos dados de contagem e redução decimal	47
3.1.1. Aeróbios mesófilos: Contagem e Redução decimal.....	47
3.1.2. Aeróbios termófilos: Contagem e Redução decimal.....	49
3.1.3. <i>Bacillus cereus</i> : Contagem e Redução decimal	51
3.1.4. Anaeróbios mesófilos: Contagem e Redução decimal	52
3.2. Análise estatística dos dados.....	54
3.2.1.PLS-DA.....	54
3.2.2. ANOVA	55
3.3. Identificação do Isolados	57
4. Discussão	60
5. Referências	65
DISCUSSÃO & CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO GERAL

A gelatina é um gel termorreversível que tem uma propriedade única de se ajustar a baixas temperaturas, tendo um ponto de fusão muito baixo, em torno de 35 a 40°C, sendo obtida pela degradação química e térmica do colágeno derivado do tecido conjuntivo animal (Sharma et al., 2006; Stevens, 1992). Sua estrutura é composta por aproximadamente 1.050 aminoácidos, dos quais: glicina (33%), prolina (22%) e por mais 16 diferentes aminoácidos que compõem os 45% restante desta proteína (Sagma, 2018; Weishardt, 2014; Schrieber and Gareis, 2007). As matérias-primas mais utilizadas comercialmente são couro bovino, couro suíno e ossos de ambos os animais, no entanto neste trabalho focaremos o processo de extração a partir de couros bovinos por esta ser a matéria-prima mais utilizada na América do Sul.

Devido às suas propriedades multifuncionais: habilidade de formar géis estáveis e reversíveis, a gelatina é amplamente utilizada na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse em seu uso (Roman, 2007; Segtnan and Isaksson, 2004).

As gelatinas comerciais são designadas como gelatinas tipo A e B sendo obtidas pela hidrólise parcial do colágeno com ácido ou álcali diluídos, respectivamente, é um produto protéico solúvel em água quente (Haug et al., 2004; Roman, 2007). Devido a variedade de fontes de colágeno e dos diferentes métodos de produção, as gelatinas comerciais apresentam diferenças em suas propriedades físicas e químicas (Bigi et al., 2004), variando em composição e na sequência de aminoácidos das cadeias polipeptídicas, quanto ao ponto isoelétrico e massa molecular (Nemati et al., 2004).

O couro bovino antes de chegar às indústrias de gelatina, passa por uma lavagem alcalina para redução da carga microbiana, entretanto não reduzirá os possíveis patógenos e esporulados; durante o transporte do couro também há chances de ocorrer contaminação (Calvo, 2002). Após o recebimento, a matéria-prima então passa pelas seguintes etapas: pré-lavagem, tratamento alcalino, lavagem, extração, centrifugação, filtração, ultrafiltração, deionização, evaporação, tanque concentrado, esterilização, extrusão e secagem (Schrieber and Gareis, 2007). Todos estes processos envolvem variações drásticas de pH e temperatura, capazes de destruir micro-organismos ali presentes, com exceção dos formadores de endósporos resistentes que sobreviverão até a etapa do produto final. O tratamento térmico aplicado pelas indústrias de gelatina para que ocorra uma redução microbiana significativa é

de 140°C por 5-12s, esta é a máxima que pode ser aplicada para que não se perca a gelatinização do produto final (Schrieber and Gareis, 2007).

Clerck *et al.* (2004) e Sharma *et al.* (2006) identificaram a presença de micro-organismos esporulados e enterobactérias em alguns pontos do processamento e nos extratos semi-finais de gelatina, indicando que o tratamento térmico aplicado não é eficiente para a esterilização total e que durante o processo existem pontos de recontaminação e formação de biofilmes, onde micro-organismos que produzem gelatinases propiciam um meio para crescimento de bactérias patogênicas Gram-. Algumas destas esporuladas com atividades de gelatinases também são patogênicas e produzem toxinas, como as do grupo de *Bacillus cereus* (De Clerck and De Vos, 2002) e *Bacillus licheniformis* (Salkinoja-Salonen et al., 1999).

Devido a grande versatilidade de usos da gelatina tanto para fins alimentícios quanto farmacêuticos, é de grande preocupação que esta esteja contaminada com micro-organismos deteriorantes e patogênicos, os quais podem afetar a saúde dos consumidores que utilizam estes produtos contaminados e causar prejuízos e perdas econômicas para as empresas produtoras. Portanto a avaliação e o estudo minucioso de todas as etapas do processamento, verificação da procedência da matéria-prima, e a identificação molecular destes micro-organismos presentes faz-se necessário para uma otimização do processo e melhoria da qualidade do produto final.

Artigos

- 1. Revisão Bibliográfica: Produção de gelatina no Brasil: Processamento e principais micro-organismos contaminantes.**
- 2. Concentração e identificação molecular de micro-organismos esporulados isolados das etapas do processamento da gelatina.**

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

Produção de gelatina no Brasil: Processamento e principais micro-organismos contaminantes

Artigo formatado de acordo com as diretrizes da revista: "*International Journal of Food Microbiology*"

Produção de gelatina no Brasil: Processamento e principais micro-organismos contaminantes

Graziele Cristina Stradiotto, Anderson de Souza Sant' Ana

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP-Brasil

34 **ABSTRACT**

35 Gelatine is a protein extracted through the partial hydrolysis of collagen present in animal
36 connective tissue; is soluble in water and able to form translucent gels widely used in the food
37 and pharmaceutical industry. The main amino acids present in gelatin are glycine (33%) and
38 proline (22%) and 16 different amino acids make up the remaining 45% of this protein. It
39 presents several applications such as the production of photographic films, papers for
40 developing photos, formulating moisturizing creams, anti-wrinkle creams, hair coloring
41 paints, shampoo, conditioner, capsule production, plasma expander formulation, suppositories
42 and drug excipients. In the food industry it is used in the formulation of sweets, gums,
43 confectionery, dairy products, meat products, desserts and as a clarifier applied during the
44 processing of juices and wines. The main raw material for gelatine in Brazil is bovine leather
45 due to its high availability. This raw material goes through several processes: pre-washing,
46 alkaline treatment, washing, extraction, centrifugation, filtration, ultrafiltration, deionization,
47 evaporation, concentrated tank, sterilization, extrusion and drying. During these steps occur
48 drastic variations of temperature and pH and even so, we can find spore forming
49 microorganisms and enterobacteria in the final product, causing great problems for both
50 industry and consumers. It is necessary to analyze all steps to verify which points occur in this
51 contamination and to apply the necessary adjustments trying to reduce the microbial load in
52 the final product.

53 **Keywords:** gelatine, collagen, spore forming microorganisms.

54 **Highlights**

- 55 - Origem, composição e propriedades funcionais da gelatina;
- 56 - Análise de todas as etapas do processo de produção e pontos de contaminação;
- 57 - Características das principais espécies contaminantes;
- 58 - Impacto na indústria de alimentos devido a produção de gelatinases e toxinas.

1.INTRODUÇÃO

1.1.Gelatina

A gelatina pode ser definida como uma proteína natural, solúvel em água, capaz de formar géis translúcidos muito utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica (Djagny et al., 2001; Gme, 2014). A gelatina é extraída através da hidrólise parcial do colágeno presente em tecidos conjuntivos animais (Clerck et al., 2004).

O colágeno é uma proteína fibrosa, que representa cerca de um terço da massa total protéica dos vertebrados. É uma cadeia polipeptídica composta por aproximadamente 1050 aminoácidos ligados, formando uma estrutura tridimensional que, após sofrer hidrólise, forma o colágeno solúvel, a gelatina (Schrieber and Gareis, 2007). A gelatina é completamente digerível e contém 18 aminoácidos diferentes, incluindo 8 dos 9 aminoácidos essenciais para o corpo humano, com exceção do triptofano, que em combinação com outras fontes de proteína ela contribui para uma alimentação saudável e nutritiva. Portanto, seu valor nutricional é estabelecido quando combinada com outras proteínas ou mistura de proteínas aumentando seu valor nutritivo e com a finalidade de suplemento protéico (Ziegler, 2006; Almeida, 2016) sendo assim, a gelatina pode ser considerada um ingrediente funcional (Harrison-Dunn, 2015). Os principais aminoácidos presentes na gelatina são a glicina (33%) e prolina (22%), sendo que mais 16 diferentes aminoácidos, compõem os 45% restante desta proteína. A hidroxiprolina é um aminoácido específico da gelatina (Tabela 1). Existem 27 diferentes tipos de colágeno: *i)* os do tipo I, são classificados como colágenos dos tecidos conjuntivos, como pele, ossos e tendões; *ii)* os do tipo II, ditos como de tecidos cartilagosos e *iii)* os do tipo III, que são dependentes da idade da pele: pele jovem contém cerca de 50% de colágeno, que com o passar do tempo é reduzido para 5 a 10%. Os outros tipos de colágeno são de órgãos específicos e encontrados em baixa quantidade (Schrieber and Gareis, 2007).

Tabela 1: Composição de aminoácidos de gelatinas e colágeno, resíduos por 1000 resíduos

Aminoácidos	Gelatina Tipo A	Gelatina Tipo B	Colágeno bovino tipo 1
Alanina	112	117	114
Arginina	49	48	51
Asparagina	16	0	16
Ácido aspártico	29	16	29
Cisteína	-	-	-
Ácido Glutâmico	48	72	48
Glutamina	25	0	25
Glicina	330	335	332
Histidina	4	4.2	4.4

Hydroxyprolina	91	93	104
Hydroxyisina	6.4	4.3	5.4
Isoleucina	10	11	11
Leucina	24	24.3	24
Lisina	27	28	28
Methionina	3.6	3.9	5.7
Fenilalanina	14	14	13
Prolina	132	124	115
Serina	35	33	35
Threonina	18	18	17
Triptofano	-	-	-
Tirosina	2.6	1.2	4.4
Valina	26	22	22

Fonte: Schrieber and Gareis (2007)

O colágeno é transformado em gelatina através da degradação físico-química e da desnaturação térmica (Harris,1990). Este processo pode resultar em produtos com propriedades diversas, como: diferentes pesos moleculares, cores, odores, rigidez, pH e níveis de contaminação microbiológica. A diversidade em propriedades/características do produto final pode ser explicada pela adoção ou não de determinadas operações unitárias no processamento, as quais podem ser mais ou menos intensas. Por exemplo, na etapa de pré-tratamento do couro, tratamentos ácidos ou básicos podem ser aplicados, o que resultará em gelatinas de tipos diferentes (Tode, 2003). A gelatina e o colágeno hidrolisado tornaram-se importantes aditivos alimentares, sendo ainda proteínas livres de glúten e com conteúdo de energia cerca de 345kcal/100g, sendo 10g de dose diária recomendada (Schrieber and Gareis, 2007).

Comercialmente, as matérias-primas mais utilizadas para fabricação da gelatina são couro bovino, couro suíno e ossos de ambos os animais. Na América do Sul, couros bovinos são as principais matérias-primas utilizadas para fabricação da gelatina. A interação da sequência de aminoácidos das moléculas de gelatina com fatores externos como pH, força iônica, temperatura e conteúdo de sais no ambiente propicia algumas propriedades funcionais à gelatina, que são desejáveis à indústrias de diversos ramos. Dentre estas propriedades destacam-se: formação de gel, texturização, propriedade espessante, capacidade de formação e estabilidade de emulsões, formação de filmes, formação e estabilização de espumas, adesão e coesão, etc. (Djagny et al., 2001). Além da aplicação na produção de filmes fotográficos, em papéis para revelação de fotos, na formulação de cremes hidratantes, cremes antirrugas, em tintas para coloração de cabelos, shampoo, condicionador e etc., a gelatina é abundantemente aplicada na produção de cápsulas, na formulação de expansor plasmático, supositórios e

excipientes de outros medicamentos. A gelatina também desempenha importante papel na indústria alimentícia, sendo utilizada na formulação de doces, gomas, produtos de confeitaria, produtos lácteos, produtos cárneos embutidos, sobremesas e como clarificante aplicado durante o processamento de sucos e vinhos (Sagma, 2018; Weishardt, 2014).

A gelatina também apresenta propriedades terapêuticas, seu consumo pode ajudar no fortalecimento da estrutura óssea, podendo ser utilizado no tratamento da artrose e osteoporose (Oesser and Seifert, 2003; Almeida, 2016). Para Koyama *et al.* (2001), o consumo da gelatina proporciona um aumento no depósito mineral do fêmur.

Uma das características mais importantes da gelatina quando aplicada em alimentos (principalmente em sobremesas de gel e água) é sua propriedade de fusão na temperatura corporal ao ser consumida. Outros hidrocolóides também apresentam a propriedade termorreversível, entretanto, a temperatura de fusão destes géis é maior que a temperatura do corpo humano (Zhou and Regenstein, 2007; Almeida, 2016).

2. O Processo de Fabricação e Qualidade e Segurança Microbiológica da Gelatina:

2.1. Matérias-Primas:

Comercialmente, as matérias-primas mais utilizadas para extração da gelatina são o couro bovino, suíno e a osseína de ambos os animais, sendo também possível produzi-la a partir de frango e peixe (Djagny et al., 2001; Karim and Bhat, 2009). No entanto, a grande disponibilidade de couro bovino em nosso país (IEPEC, 2015), faz com que esta seja a principal matéria-prima para fabricação da gelatina no Brasil.

Pode-se dizer que o processo de fabricação da gelatina tem início na etapa de esfolagem durante o abate de bovinos, com operações de pré-tratamento do couro. Embora os confinamentos restritos apresentem menores chances de contaminação do couro bovino do que pastagens extensivas ambos são ambientes propícios para contaminação do couro bovino, principalmente pela deposição das fezes destes animais em locais onde, possivelmente, entram em contato com o couro do animal (Jardim et al., 2006). Antes do abate, estes animais passam por uma lavagem que é capaz de reduzir a carga bacteriana presente no couro, mas não é capaz de eliminar possíveis patógenos. Durante a esfolagem existem práticas para evitar o contato do couro com a carne do animal para evitar contaminação do produto cárneo e de seus derivados (Jardim et al., 2006).

Após a esfolagem, o couro retirado é enviado para curtumes onde são lavados com soluções alcalinas para a retirada dos pêlos. Posteriormente, é feita a separação das três camadas da pele: a parte externa (utilizada para produção do couro propriamente dito), a camada inferior

(que apresenta resquícios de carne) e a parte interna ou camada intermediária (composta basicamente de colágeno), que será destinada às indústrias de gelatina (Calvo, 2002). Atualmente, alguns curtumes fazem uso de cloreto de sódio para conservação do couro durante o transporte (Calvo, 2002), enquanto outros podem aplicar biocidas e, ou inseticidas, para evitar a multiplicação de micro-organismos e/ou parasitas capazes de deteriorar o couro, ou congelar o couro para transporte e armazenamento (Pacheco, 2005).

O desenvolvimento e padronização de estratégias para transporte e conservação do couro bovino podem influenciar positivamente na qualidade microbiana da gelatina, evitando multiplicação da carga bacteriana natural presente em sua superfície. Quanto menor a carga bacteriana inicial maior será a eficiência da atuação dos processos de redução bacteriana durante o processo de produção.

2.2. O Processamento da Gelatina

As indústrias devem adquirir o couro bovino apenas de abatedouros certificados para garantir assim que a matéria-prima utilizada seja oriunda de animais saudáveis e aptos para o consumo humano (Gem, 2014; Clerck et al., 2004). O Fluxograma do processo de produção da gelatina é mostrado na figura 1.

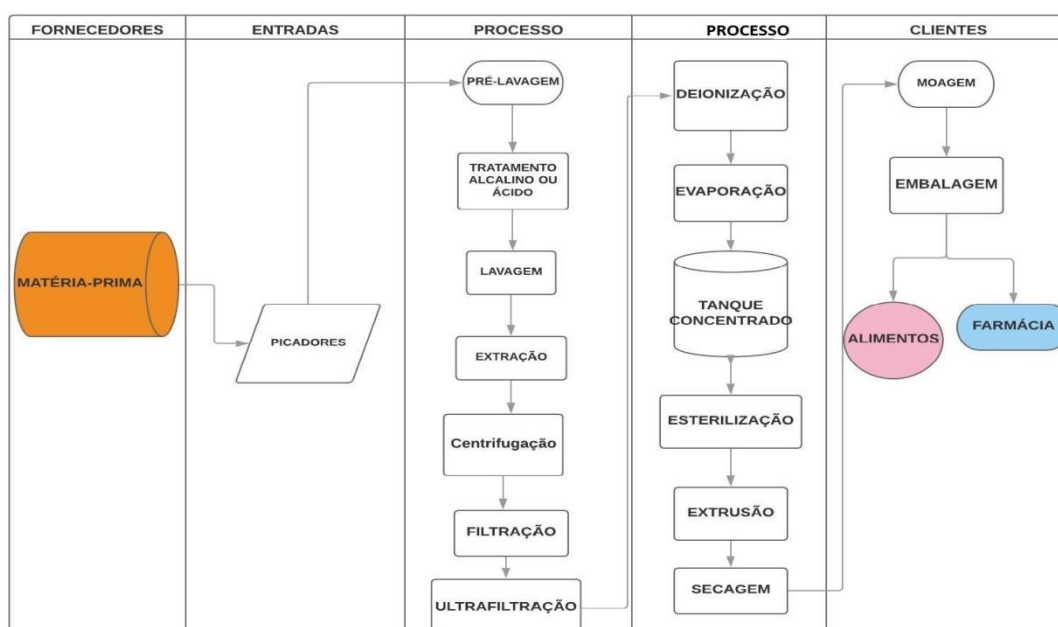


Fig.1. Fluxograma da produção de gelatina

Na recepção da matéria-prima a pele é inspecionada e transportada aos picadores para reduzir o tamanho dos pedaços de acordo com as especificações. Após os picadores, a pele é

transportada para uma pré-lavagem. Na pré-lavagem a pele é submetida a uma lavagem com água. É adicionado soda cáustica e /ou Cal e/ou enzima proteolítica e/ou peróxido de hidrogênio e/ou hipoclorito. O processo inicia-se com a pré-lavagem de sódio e/ou detergentes alcalinos de acordo com o tipo de matéria-prima. A solução é mantida em constante agitação. Da pré-lavagem, o material segue para o tratamento alcalino (Tipo B) ou pode ser transportado diretamente para o tratamento ácido (Tipo A) (Schrieber and Gareis, 2007). É nesta etapa que ocorrem as primeiras quebras das moléculas de colágeno. Para extração da gelatina do tipo A, a matéria-prima deve ser tratada com soluções ácidas com concentrações em torno de 5% da massa total de matéria-prima por 10 a 48 horas, temperatura entre 14 e 25°C e pH em torno de 3,5 a 4,5 (Courts, 1977). Para extração da gelatina do tipo B, a matéria-prima é tratada com hidróxido de sódio em concentrações entre 2 a 5% do peso total de matéria-prima, por um período de 6 a 20 semanas, com pH em torno de 11,5 a 13,5 e temperatura entre 14 e 25°C (Courts, 1977). O tempo de tratamento depende do tipo de matéria-prima (raspa ou aparas) e o tipo de extração (Batelada ou contínua). Para matérias-primas com alto teor de gordura, como a pele de suíno e a pele de frango, é mais indicado o tratamento ácido para evitar a saponificação que ocorre no tratamento alcalino (Schrieber and Gareis, 2007; Almeida, 2016). A solução alcalina promove a quebra das ligações secundárias da estrutura do colágeno, causando a saponificação da gordura e eliminação de proteínas não colagênicas. O tratamento é realizado em tanques individuais (com volume de 68m³). A origem da matéria-prima de cada tanque (fornecedor) é identificada e registrada (Schrieber and Gareis, 2007).

O início do processo de produção é um ponto com grande potencial de estudo para desenvolvimento de processos que visem à redução da carga bacteriana inicial proveniente da matéria-prima, entretanto não existem pesquisas ou relatos que abordem a diferença da qualidade microbiana correlacionando com os diferentes processos de pré-tratamento. Estudos estatísticos aprofundados que correlacionem o tempo, a concentração e a solução, ácida ou alcalina, utilizada podem sugerir novos processos produtivos que sejam mais eficazes quanto à qualidade microbiológica do produto final.

Após o tratamento alcalino/ácido, o couro é bombeado até a etapa de lavado. Tanques de madeira de 60m³ de volume e providos de agitador horizontal são utilizados nessa operação e normalmente cada tanque de calado gera 1 lote de lavado. Assim a rastreabilidade do material é mantida durante todas as etapas do processo. Nesta etapa a matéria-prima é tratada com ácido sulfúrico e/ou peróxido de hidrogênio e /ou hipoclorito de sódio e/ou detergentes alcalinos e água limpa. A solução cáustica é adicionada apenas para pequenas

correções quando necessário. O pH é mantido entre 1,0 a 5,0 (etapa de ácido) de acordo com o tipo de extração e o material utilizado. O tempo total do processo gira em torno de 25 a 45 horas. A acidulação do material é realizada para se obter o pH ideal para a extração do colágeno na próxima etapa do processo. Ao final desta lavagem as raspas bovinas apresentam-se brancas e são submersas em tanques de aço inoxidável, seguindo-se aquecimento à 45-100°C para a etapa de extração. Esse processo tem que ser o mais breve possível para que o tempo dentro do extrator seja pequeno evitando-se assim perdas das características físicas da gelatina obtida. Nesta etapa o pH da solução de gelatina permanece entre 2,0-7,0. A gordura gerada é retirada dos extratores e armazenada e estocada na estação de tratamento de esgoto até sua retirada. Ao sair dos extratores a solução de gelatina tem concentrações entre 1,5 a 6% (Schrieber and Gareis, 2007).

Este processo pode ocorrer mais de uma vez para a mesma matéria-prima inicial até que todo o colágeno seja extraído. Os diferentes caldos obtidos após cada ciclo de extração seguirão pelo processo e diferentes qualidades de gelatina serão produzidas devido à diminuição de colágeno nos tecidos a cada ciclo. Quanto maior a temperatura e tempo de exposição à tais soluções, maior a degradação da gelatina. Portanto, os caldos oriundos dos últimos ciclos de extração do colágeno originarão gelatinas com menor poder de gelificação do que os primeiros caldos, que foram expostos à condições menos drásticas (Courts, 1977).

Após a extração, a solução de gelatina é bombeada para centrífugas (etapa de centrifugação) para remoção de materiais leves como gorduras e fibras e contaminantes físicos quando houver. Realiza-se a primeira filtração em filtros prensa, onde a temperatura é mantida entre 45 e 65° e o pH entre 2,0 -7,0. As polpas de celulose utilizadas são recicladas em tanques, limpas com água, detergente neutro e/ou hipoclorito de sódio e ou/ácido peracético. Na próxima etapa de ultrafiltração um sistema de membranas espirais com poros é utilizado para remoção de água e sais. Ao final do processo de ultrafiltração, a solução de gelatina atingirá concentrações de 8 a 10% (Schrieber and Gareis, 2007). As polpas de celulose utilizadas devem passar por um crítico processo de recuperação para eliminar as possibilidades de uma transferência de contaminação entre um processo e outro. Devido ao tempo e a condição de temperatura e pH nesta etapa não é esperada a multiplicação dos micro-organismos. No entanto, o intervalo de utilização destas polpas deve ser avaliado considerando que a carga microbiana é capaz de reter-se tornando-se um ponto de recontaminação. A tubulação onde ocorre a ultrafiltração deve ser monitorada freqüentemente para identificação e eliminação de pontos mortos, os quais podem vir a ser grande fonte de contaminação por propiciar o crescimento bacteriano e a formação de biofilmes.

Para redução de cinzas, o concentrado de gelatina é submetido à deionização (catiônica e aniônica). Nesta etapa, a temperatura permanece entre 45-65°C e o pH varia inicialmente de 10-11, atingindo ao final, valores entre 4,5-6,0. As resinas utilizadas para deionização da solução de gelatina são capazes de reter microrganismos, funcionando como uma espécie de filtro, mas ainda é necessário realizar estudos estatísticos da carga microbiana antes e após a passagem pelo deionizador para estimar a capacidade de redução destes microrganismos e avaliar quanto tempo esta resina deixa de atuar como redutor da carga bacteriana e passa ser um ponto de retroalimentação devido a quantidade de microrganismos já retidos, para então passar a considerar este ponto como um ponto crítico de controle para redução da carga bacteriana. Como forma de minimizar a contaminação nas etapas subsequentes, a troca com frequência destas resinas faz-se necessária.

Então, a solução de gelatina é submetida a uma segunda filtração em filtros de celulose para remoção de todas as partículas em suspensão. Primeira evaporação ocorre em evaporadores de triplo efeito e a concentração final da gelatina fica no mínimo em 15%. A temperatura varia de 50-100 °C e o pH entre 4,5- 8,0. A solução permanece em Tanques de concentrado, é nesta etapa que se realiza a preparação final da gelatina; pode ser adicionado hidrosulfito de sódio para reduzir o efeito da reação de Maillard (escurecimento da gelatina) e/ou ácidos e enzimas; é feito uma correção de pH (entre 5,0-6,5) (Reinhard and Herbert, 2007). A esterilização (injeção de vapor direto) é a próxima etapa visa assegurar a qualidade microbiológica do produto, porém ao contrário dos processos convencionais, nos quais o produto é mantido por período prolongado à altas temperaturas, no caso da gelatina, um longo período de exposição pode levar à degradação das proteínas à níveis que inviabilizam quaisquer aplicações do produto final (Courts, 1977; De Clerck and De Vos, 2002). Desta forma, o processo de esterilização da gelatina deve ocorrer entre o limiar da redução da carga microbiana e a integridade da gelatina, mantendo o poder de gelificação desejado para as aplicações posteriores. Irradiação Ultra-Violeta e secagem a 95°C seguidos de esterilização a temperaturas de 120 a 125°C já foram testados no decorrer da história da indústria de gelatina, como formas de esterilizar o produto sem que houvesse degradação de suas propriedades físico-químicas, ambas com resultados não eficientes, devido ao baixo poder de penetração do UV e de temperaturas que não destruíam os esporos (Courts, 1977). Atualmente, na maioria das indústrias produtoras de gelatina, a temperatura utilizada para esterilização é maior ou igual 140°C e período de exposição varia entre 5 a 12 segundos. O tempo e a temperatura ao qual a gelatina é exposta podem ser insuficientes para reduzir a carga de certos microrganismos como o caso dos esporulados que são capazes de sobreviver à temperatura de

140°C (Huemer et al., 1999), bactérias sulfito-redutoras, as pertencentes ao grupo de *Bacillus cereus* e não esporulados, como bactérias Gram negativas potencialmente patogênicas (Clerck et al., 2004; De Clerck and De Vos, 2002; Pirttijärvi et al., 2000; Sharma et al., 2006). Como a gelatina não é um produto comercialmente estéril, o termo redução/inativação microbiana parece ser o ideal para descrever esta etapa do processamento (Courts, 1977).

Após a esterilização, ocorre uma segunda evaporação onde a concentração da gelatina atinge 25% e a temperatura fica em torno de 45-65 °C. O concentrado obtido é transferido para tanques de aço inox onde permanece por 4h. Este período pode proporcionar condições de desenvolvimento bacteriano à células injuriadas, mas ainda viáveis, para reparo celular e reinício de suas atividades metabólicas para multiplicação. Desta forma é essencial que ao chegar a esta etapa do processo a carga bacteriana já tenha sido reduzida para evitar que o produto final seja reprovado perante as especificações farmacêuticas e alimentícias. É de grande importância a cautela com a higienização deste e de outros pontos posteriores à redução bacteriana para que seja evitado o processo de recontaminação.

Após, a solução de gelatina seguirá para uma tubulação onde ocorre a etapa do resfriamento realizado através de mantas de amônia. Gelificada, a gelatina passa então por discos perfurados que permitem a obtenção de cordões de gelatina assemelhando-se a macarrão (*gelatin noodles*)- etapa de extrusão. Estes cordões de gelatina são levados ao secador por esteiras rolantes- Secagem. Após sua gelificação e seu corte a gelatina deixa um sistema fechado e passa ter contato com o ar ambiente, que deve ser controlado a fim de evitar a sedimentação de micro-organismos. A esteira oscilante que levará a gelatina até a entrada do secador também pode ser uma fonte de contaminação, pois seu contato direto com a gelatina pode transferir possíveis micro-organismos presentes. Desta forma sua higienização deve ser realizada, com sanitizantes adequados, constantemente (Schrieber and Gareis, 2007).

O secador é alimentado com uma corrente de ar previamente filtrado, descontaminado e aquecido, sendo que a temperatura é gradativamente elevada nos diferentes estágios do equipamento, variando de 25 a 80°C. Após aproximadamente 4 horas de secagem, a gelatina passa pelo processo de moagem, onde é granulada de acordo com a malha especificada pelo cliente. Nessa fase, a gelatina está com um grau de umidade de 10%, e assim é embalada em embalagens de polietileno e estocada (Schrieber and Gareis, 2007).

3. Micro-organismos Contaminantes da Gelatina:

A diversidade e quantidade de micro-organismos presentes na gelatina é resultado da carga microbiana inicial da matéria-prima e do impacto das etapas de processamento deste

produto. O couro bovino é fonte de diversos micro-organismos devido ao seu contato direto com o ambiente externo. As pastagens são ambientes propícios para a contaminação do couro bovino, principalmente devido às fezes e solo que contaminam os pêlos e o couro dos animais (Jardim et al., 2006). Apesar da lavagem pré-abate dos animais diminuir a carga bacteriana presente no couro bovino, as populações microbianas ainda são muito altas e abrangem diversos gêneros microbianos. Neste sentido, estudos demonstram que as contagens de aeróbios mesófilos viáveis pode atingir valores tão altos quanto $6,2-10,5 \log_{10}$ UFC/cm² (Gill et al., 2000), além da presença de coliformes, *Escherichia coli* e outras enterobactérias (Arthur et al., 2007; Barkocy-Gallagher et al., 2005; Byrne et al., 2000).

Se informações, ainda que limitadas, sobre os micro-organismos presentes no couro bovino usado para processamento de gelatina podem ser encontradas na literatura (Arthur et al., 2007; Barkocy-Gallagher et al., 2005; Byrne et al., 2000; Jardim et al., 2006) dados sobre os micro-organismos presentes em diferentes etapas do processamento e nos produtos finais (gelatina) são raros. Por exemplo, Sharma *et al.* (2006) pesquisaram a presença de enterobactérias em diferentes pontos do processo de produção da gelatina: antes da filtração, tanque de equilíbrio, antes e depois da deionizadora, antes das evaporadoras, após a evaporadora, antes e depois da esterilização, após gelificação e extrusão e a gelatina seca. Os micro-organismos encontrados foram *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Salmonella* Typhi, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Shigella flexneri* e *Serratia liquefaciens*. Das 142 amostras analisadas, foi evidenciada contaminação por estes micro-organismos na solução não concentrada de gelatina, na solução concentrada de gelatina, após gelificação, extrusão da gelatina e na esteira transportadora. Já no que concerne ao produto final, De Clerck *et al.* (2004) recuperaram 1.129 isolados bacterianos a partir de 73 lotes de gelatina oriundos de seis diferentes plantas de produção. Estes isolados foram caracterizados através do seqüenciamento do DNA ribossomal 16S que possibilitou a identificação de micro-organismos como *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. fumarioli*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis*, *B. subtilis*, *B. gelatini*, *B.thermoamylovorans*, *Anoxybacillus contaminans*, *A. flavitehermus*, *Brevibacillus agri*, *B. borstelensis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Enterobacter sakazakii*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*, *S. pasteurii* e *Staphylococcus* spp..

A preocupação com a presença de contaminantes microbiológicos na gelatina se dá pelo fato de que alguns micro-organismos possuem atividade de gelatinases, capazes de liquefazer a gelatina e propiciarem meio viável para o desenvolvimento de outros micro-organismos que não são capazes de hidrolisar as suas moléculas. A elevada incidência de micro-organismos

esporulados na gelatina capazes de produzirem gelatinases foi reportada por De Clerck *et al.* (2004). Desta forma, mesmo que estes micro-organismos liquefacentes não sejam patogênicos, eles podem propiciar condições para o desenvolvimento de patógenos e assim, comprometer a inocuidade da gelatina e dos produtos que a utilizam como matéria-prima. Além disso, outro aspecto extremamente relevante é o prejuízo econômico causado pela deterioração de alimentos processados nos quais este insumo contendo elevadas cargas de micro-organismos esporulados é adicionado.

3.1. Classificação e Características do gênero *Bacillus*

O gênero foi criado em 1872 por Ferdinand Cohn, que mudou o nome de "*Vibrio subtilis*" de Ehrenberg (1835) para *Bacillus subtilis* e a primeira classificação do gênero *Bacillus* foi feita por Smith, Gordon e Clark, 1946 (Harwood, 1989).

A partir da década de 90 com a tecnologia de sequenciamento e análises da sequência 16S rRNA Ash *et al.* (1994) concluíram que existiam 5 grupos distintos que poderiam ser classificados como gêneros diferenciados. Atualmente entre os diversos novos gêneros, podemos citar: *Paenibacillus* (quase um *bacillus*,) envolvendo anaeróbios facultativos e mesófilos, *Brevibacillus* (*bacillus* curtos) quase todos aeróbios e mesofílicos, *Virgibacillus* (ramificação dos *bacillus*) mesofílicos moderadamente aerotolerantes, *Alicyclobacillus* (contendo ácido graxo cíclico na parede) acidófilos, moderadamente termofílicos entre outros. Alguns termofílicos foram incluídos no gênero do *Geobacillus* devido a origem ser proveniente do solo (Reyes, 2008) (Fig. 2). As bactérias do gênero *Bacillus* são bastonetes Gram-positivos aeróbios ou anaeróbios facultativos, produtores de catalase, diferentemente de *Clostridium* que são anaeróbios estritos e catalase negativa e do gênero *Sporolactobacillus*, que não são produtores de catalase e são microaerófilos, e *Desulfotomaculum*, que são obrigatoriamente anaeróbios formadores de endósporos (Stadhouders, 1992). Os *Bacillus* são Gram +, móveis em sua maioria, com flagelação peritríquia, bastonetes grandes, medindo aproximadamente 1,0 a 7,0 μ m de comprimento. O pH mínimo para multiplicação pode variar de 2,0 a 8,0, a tolerância ao sal pode ser pequena (2%) ou alta (25%). São quimio-heterotróficos, ou seja, versáteis no aproveitamento metabólico de substratos orgânicos; alguns são proteolíticos, outros lipolíticos e amilolíticos. Produzem anaerobicamente ácido a partir de açúcares, sendo que poucos produzem gás sendo a maioria saprófita (Massaguer, 2006; Reyes, 2008). O gênero é um dos grupos de micro-organismos mais diversos e comercialmente úteis.

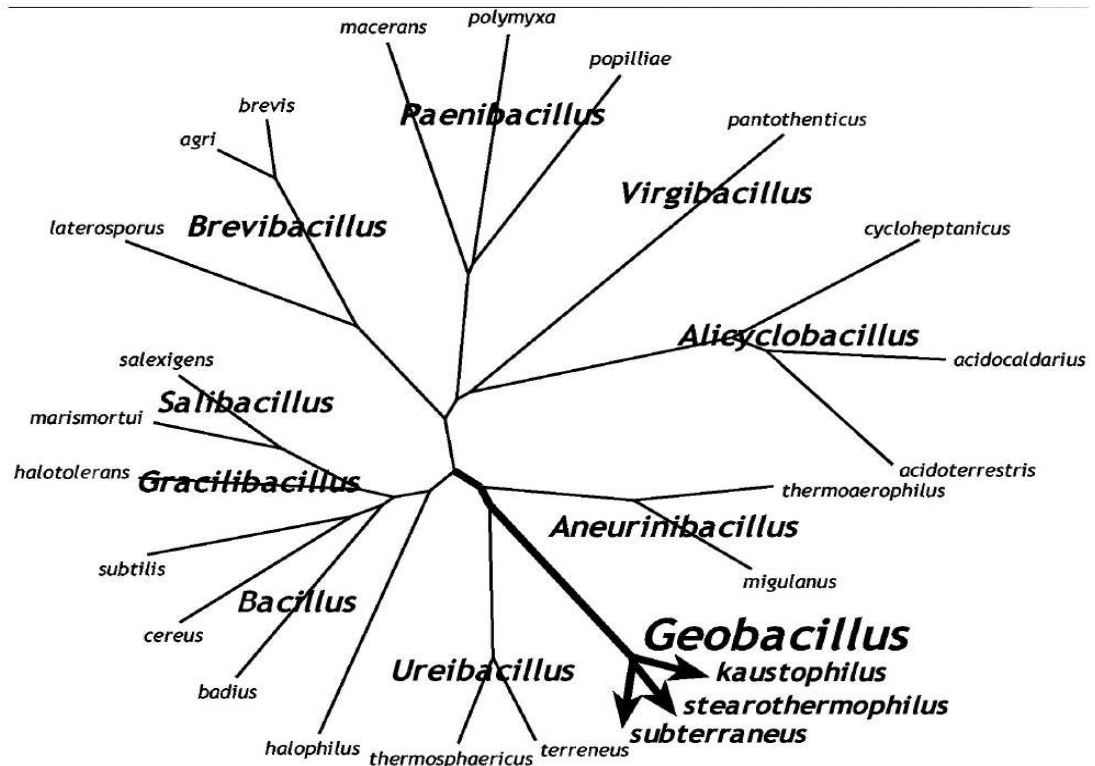


Fig.2. Árvore filogenética baseada no alinhamento do 16SrRNA para reclassificação do gênero *Bacillus*

Representantes deste gênero são amplamente distribuídos no solo, ar e água onde eles estão envolvidos em uma série de transformações químicas. A capacidade de certas cepas tolerarem grandes variações de temperatura e pH tornou-as uma fonte particularmente importante de enzimas comerciais (Norris et al., 1981). Devido a diversidade metabólica de *Bacillus* spp., os representantes deste grupo são utilizados em uma grande gama de processos industriais (Harwood, 1989). Entretanto algumas espécies apresentam patogenicidade como *Bacillus cereus*, que produz toxinas que causam gastroenterites, *Bacillus anthracis*, um agente patogênico de humanos e alguns animais, *Bacillus thuringiensis* patógeno de insetos (Harwood, 1989), e mais recentemente também considerada patogênica por produzir toxinas *Bacillus licheniformis* (Salkinoja-Salonen et al., 1999).

3.1.1. Características da espécie *Bacillus cereus*

Bacillus cereus constitui-se de um bastonete grande disposto em cadeias curtas e/ou longas, com esporos elipsoidais, na posição central a subterminal sem intumescimento do esporângio. É aeróbio facultativo, com pH de crescimento entre 4,9 e 9,3; é um mesofílico

típico com temperatura máxima de crescimento entre 48-50°C e mínima entre 4-5°C de acordo com FDA (1998) e citado por (Pacheco-Sanchez, 2005; Reyes, 2008).

Alimentos contaminados com concentrações maiores que 10^6 UFC/g de *Bacillus cereus*, podem causar duas síndromes: a síndrome emética que é causada pela ingestão da toxina emética estável ao calor (Cereulida, um peptídeo cíclico de 1,2 kDa) produzido em alimentos e a síndrome diarreica que é principalmente devido à ingestão de células de *B. cereus* nos alimentos, seguido pela produção de toxina no intestino (Kramer & Gilbert, 1989; Drobniewski, 1993; Granum, 1997; Carlin et al., 2006).

A toxina diarreica tem peso molecular de 38-39,5Kda, é produzida na fase exponencial e, principalmente na fase estacionária do crescimento. Algumas linhagens de *B. cereus* produzem a toxina quando submetidas a temperaturas de 4°C, outras entre 6 e 21°C. Se o alimento é ingerido, quando a célula vegetativa se lisa no intestino, a toxina é liberada. Neste caso, os sintomas da intoxicação são dores abdominais constantes e diarreia fraca após 4 a 16 horas da ingestão, permanecendo por até 24 horas, mas sem febre (Jay,1992; FDA,1998;Pacheco-Sanchez, 2005; Reyes, 2008).

A síndrome emética é mais grave e mais aguda. A incubação varia de 1 a 6 horas com duração de 5 horas. Sua produção ocorre durante a esporulação do micro-organismo cujas linhagens apresentam temperatura ótima de crescimento entre 35-40°C. A toxina emética apresenta baixo peso molecular (5.000da), sendo estável frente à variação de pH e de temperatura. (Jay,1992; FDA,1998;Pacheco-Sanchez, 2005; Reyes, 2008).

3.1.2. Características da espécie *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis é uma bactéria esporulada, Gram-positiva e amplamente distribuída como um organismo saprófita no meio ambiente. Por ser anaeróbio facultativo, tem capacidade de crescer em variados nichos ecológicos. Certos isolados de *B. licheniformis* são capazes de desnitrificação; a relevância desta característica para desnitrificação ambiental pode ser pequena, no entanto, espécies geralmente persistem no solo como endósporos (Rey et al., 2004).

Existem numerosos usos comerciais e agrícolas para *B. licheniformis* e seus produtos extra-celulares. A espécie tem sido utilizado há décadas na fabricação de enzimas incluindo várias proteases, α -amilase, penicilinase, pentosanase, cicloglucosiltransferase, β -mananase e várias enzimas pectinolíticas (Rey et al., 2004).

Apesar do uso benéfico, *Bacillus licheniformis* juntamente com *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* que compreendem o grupo subtilis, tem sido associado a deterioração de alimentos, como pão, contaminante de produtos lácteos e incidentes de gastroenterites de origem alimentar com uma gama de condições clínicas (Salkinoja-Salonen et al., 1999). *B. licheniformis* também tem sido associada a septicemia, peritonite, oftalmite e intoxicação alimentar em seres humanos, bem como toxemia e abortos em bovinos (Salkinoja-Salonen et al., 1999; Turnbull, P. C. B. and J. M. Kramer, 1995; Johnson et al., 1994).

Já foram relatados surtos de *B. licheniformis* transmitidos por alimentos associados a carnes, legumes cozidos, pães, leite cru e de alimentos industrializados para recém-nascidos (Lund, 1990; Rosenkvist, 1995; Salkinoja-Salonen et al., 1999). Clerck *et al.* (2004) identificaram a presença de *Bacillus licheniformis* nos extratos semi-finais de gelatina, sendo que além das propriedades patogênicas, também possuem uma atividade de gelatinase e a degradação enzimática da gelatina afeta sua viscosidade e portanto, a qualidade do produto em si e suas aplicações. Além disso, devido a essa degradação, nutrientes essenciais podem se tornar disponíveis para contaminantes gelatinase-negativos, promovendo seu crescimento (De Clerck et al., 2004).

3.1.3. Características da espécie *Geobacillus stearothermophilus*

São aeróbios ou anaeróbios facultativos e termófilos obrigatórios. Apresentam-se em forma bastonete Gram positivos + ou Gram variável, em arranjos simples ou cadeias curtas, com motilidade mediante flagelos peritríquios. Os endosporos são elipsóides ou cilíndricos com localização terminal ou subterminal e esporângio levemente entumescido ou não (Reyes, 2008; Zeigler, 2001).

Este microrganismo apresenta a característica de fermentar carboidratos com a subsequente formação de ácidos graxos de cadeia curta, causando a acidificação do produto sem a produção de gás e por isso, sem causar deformação na embalagem. Apesar de ser considerado obrigatoriamente termófilico, na prática células vegetativas podem crescer na faixa de 37 à 75°C com ótimo a 55-65°C e faixa de pH entre 6,0 e 8,5. A grande maioria produz catalase. Podem produzir também ácido lático sem gás a partir da frutose, glucose, maltose, manose e sacarose (Reyes, 2008; Zeigler, 2001).

Se o alimento for mantido a temperaturas de 43-75 °C durante o processamento, poderá servir como uma fonte para o acúmulo excessivo de esporos deste microrganismo, que, devido à sua alta resistência térmica, não são eliminados durante o tratamento térmico aplicado. O esfriamento inadequado do produto após tratamento térmico também contribui

para o desenvolvimento da deterioração “Flat Sour” no Produto Final. Produzem esporos extremamente resistentes ao calor, apresentando o valor $D_{121^{\circ}\text{C}}$ entre 4 e 5 minutos e um valor Z entre 7,8-12,2 $^{\circ}\text{C}$, e apresenta alta resistência também à produtos químicos, sendo assim, os esporos são de difícil destruição quando presentes tanto no alimento como na linha de processamento (Reyes, 2008; Zeigler, 2001).

De Clerck *et al.* (2004) identificaram a presença de *Geobacillus stearothermophilus* em extratos semi-finais de gelatina e esta espécie não apresentou atividade de gelatinases.

Para minimizar a contaminação por *G. stearothermophilus*, faz-se necessário a sanitização correta dos equipamentos e das superfícies que entram em contato com o alimento, além do controle da contaminação destes microrganismos em ingredientes e em produtos que entram na linha de produção (Reyes, 2008; Olson & Sorrells, 2001).

3.2. Características do gênero *Clostridium*

São anaeróbios estritos, bastonetes Gram positivos, formadores de esporos, não produzem catalase, com exceção de algumas espécies aerotolerantes. Podem ser encontrados em diversos sedimentos e no trato gastrointestinal do homem e animal. Seus esporos estão presentes no solo, poeira, forragem, água, animais e seus excrementos (Reyes, 2008; Van Dender, 2006).

Os efeitos do desenvolvimento destes micro-organismos esporulados são: rancificação, perda da consistência do produto, putrefação e proteólise. Os clostrídios que causam a fermentação butírica são normalmente denominados de bactérias ácido butíricas, sendo *C. tirobutyricum*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. sporogenes* e *C. bifermentans*, as principais espécies. O defeito mais relevante e economicamente mais importante, causado por esse grupo, é o estufamento tardio (Reyes, 2008; Van Dender, 2006).

O baixo potencial redox em carnes animais favorece o crescimento de micro-organismos anaeróbios (Feitosa, 1999) e com isso o couro bovino que é a principal matéria-prima utilizada na fabricação da gelatina poderá estar contaminada com estes micro-organismos, sendo que seus esporos sobreviverão em algumas etapas do processamento.

3.3. Características de Coliformes

Organismos coliformes são bastonetes gram-negativos, que possuem, como habitat natural, o trato intestinal do homem e de animais. Pertencem à família Enterobacteriaceae, incluindo muitos gêneros, tendo como principais a *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*,

Enterobacter, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Citrobacter* (Sousa et al., 2006). Podem ser divididos em coliformes totais e fecais, dependendo do habitat do micro-organismo. A denominação coliformes fecais foi utilizada durante muitos anos para descrever coliformes que fermentavam a lactose com produção de gás a 44,5°C. Entretanto não é correta a relação direta da presença de coliformes termotolerantes em alimentos e água com contaminação de origem fecal, o que levou à necessidade de modificar, na legislação brasileira, a denominação coliformes fecais para coliformes a 45°C. *Escherichia coli* e algumas cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais. *Klebsiella* e *Enterobacter* podem ser encontrados em outros ambientes, como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal (Cavalli, 2006).

Através da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) O Ministério da Saúde adotou a denominação coliformes a 45°C, considerando os padrões “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes” como equivalentes a coliformes a 45°C (Ministério da saúde, 2018).

Devido à sua natureza protéica e à presença de açúcares residuais, a gelatina atua como um excelente meio para o crescimento de muitos micro-organismos, incluindo enterobactérias, como por exemplo, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* e *Serratia liquefaciens* que foram isoladas e identificadas no trabalho de Sharma et al. (2006).

Estas bactérias entéricas isoladas da gelatina além de possuírem propriedades patogênicas, algumas delas são gelatinolíticas e, portanto, têm um efeito significativo na qualidade e conteúdo de aminoácidos da gelatina, sendo de grande preocupação tanto para os fabricantes quanto para os consumidores (Sharma et al., 2006).

Apesar das condições extremas de temperaturas e pH aplicadas durante o processamento da gelatina, verifica-se que várias espécies de micro-organismos tanto Gram + como Gram - podem ser encontradas desde a matéria-prima, durante as etapas do processo e persistindo no produto final, fazendo-se necessário a análise minuciosa de todas as etapas com a sanitização correta dos equipamentos e das superfícies que entram em contato com a gelatina e principalmente a verificação da procedência do couro bovino, a matéria-prima utilizada que é a principal fonte de contaminação.

REFERÊNCIAS

- Almeida, P.F., 2016. Aplicação de gelatina obtida de subproduto animal como substituto parcial de gordura em spread de chocolate. USP.
- Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Guerini, M.N., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., 2007. Transportation and Lairage Environment Effects on Prevalence, Numbers, and Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on Hides and Carcasses of Beef Cattle at Processing. *J. Food Prot.* 70, 280–286. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.280>
- Ash, C., Priest, F.G., Collins, M.D., 1994. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>
- Barkocy-Gallagher, G.A., Edwards, K.K., Nou, X., Bosilevac, J.M., Arthur, T.M., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., 2005. Methods for Recovering *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle Fecal, Hide, and Carcass Samples: Sensitivity and Improvements. *J. Food Prot.* 68, 2264–2268. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2264>
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001 Acess in: 2018. Available in: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/1201rdc>.
- Byrne, C.M., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., 2000. The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 142–145. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00689.x>
- Calvo, 2002. Estratégia em curtiembre: um estudo de caso 1. Faculdades Integradas Antonio Eufrásio de Toledo de Presidente Prudente. Available in: <http://intertemas.toledoprudente.edu.br/index.php/ETIC/article/viewFile/941/912>
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinojasalonon, M., Svensson, B., Nguyenthe, C., Ehlinhschulz, M., 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022>
- Cavalli, D.R., 2006. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos I-3, v. 26, 352–359.
- Clerck, E. De, Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J., Vos, P. De, 2004. Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts Isolation ,

- Characterization , and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts. *Am. Soc. Microbiol.* 70, 3664–3672. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3664>
- Courts, A.. W.A., 1977. The science and technology of gelatin. *J. Colloid Interface Sci.* 66, 373–374. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(78\)90323-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(78)90323-5)
- De Clerck, E., De Vos, P., 2002. Study of the bacterial load in a gelatine production process focussed on *Bacillus* and related endosporeforming genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 611–617. <https://doi.org/10.1078/07232020260517751>
- de Clerck, E., Devos, J., de Vos, P., 2004. Molecular Characterisation of Bacterial Contamination in Semi-Final Gelatine Extracts, Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 612–619. <https://doi.org/10.1078/0723202041748217>
- De Clerck, E., Van Mol, K., Jannes, G., Rossau, R., De Vos, P., 2004. Design of a 5'?? exonuclease-based real-time PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus licheniformis*, members of the “*B. cereus* group” and *B. fumarioli* in gelatine. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 109–115. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01550.x>
- Djagny, K.B., Wang, Z., Xu, S., 2001. Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41, 481–492. <https://doi.org/10.1080/20014091091904>
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 1998. *Bacteriological Analytical manual*. 8th edition. Revision A, Chapter 14.
- Feitosa, T., 1999. Contaminação, Conservação e alteração da carne. EMBRAPA. Available in: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/421977/1/Dc034.pdf>
- Francis A. Drobniowski, 1993. *Bacillus cereus* and Related Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324–338.
- Gem: Gelatine Manufactures for Europe. About gelatine. access in 24 mar.2014. Available in: <http://www.gelatine.org/en/about-gelatine/properties.html>.
- Granum, E.. T.L., 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 223–228.
- Harris, P. and J.-B.F., n.d. *FOOD GELS Microstructural Principles of Food Processing and Engineering Biotechnology Applications in Beverage Production*. London.
- Harrison-Dunn, A. Gelatin is more than just a texturizer. 2015. Access in 10. Jan.2019. Available in: <https://www.nutraingredients.com/content/view/print/1188821>
- Harwood, C.R., 1989. *Bacillus*, V.2. ed. United Kingdom. <https://doi.org/DOI 10.1007/978-1->

583 4899-3502-1

584 Huemer, I.A., Klijn, N., Vogelsang, H.W.J., Langeveld, L.P.M., 1999. Thermal Death
585 Kinetics of Spores of 6946, 851–855.

586 Jardim, F.B.B., Silva, E.N. da, Okura, M.H., Ramos, M.A., 2006. Influência dos sistemas de
587 pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. *Ciência e*
588 *Tecnol. Aliment.* 26, 277–282. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200008>

589 Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*. 4th ed. New York: Van NostrandReinhold, 1992.

590 Johnson, C. T., G. R. Lupson, and K. E. Lawrence. 1994. The bovine placentome
591 in bacterial and mycotic abortions. *Vet. Rec.* 134:263–266.

592 Karim, A.A., Bhat, R., 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an
593 alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll.* 23, 563–576.
594 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>

595 Koyama, Y., Hirota, A., Mori, H., Takahara, H., Kuwaba, K., Kusubata, M., Matsubara, Y.,
596 Kasugai, S., Toh, M. and Irie, S., 2001. *J NutrSci Vitaminol*, 47, 84-86, 2001. *J. Nutr. Sci.*
597 *Vitaminol* 84–86.

598 Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P.
599 (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 21–70.

600 Lund, B.M., 1990. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet* 336,
601 982–986. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92431-G](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92431-G)

602 Massaguer, P. R. *Microbiologia dos Processos Alimentares*. São Paulo, Editora Varela 2005,
603 p. 258.

604 Norris, j. R., Berkeley, R. C. W., Logan, N. A., and O'Donnell, A. G., 1981, The genera
605 *Bacillus* and *Sporolactobacillus*, in: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and*
606 *Identification* (M. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. Schlegel, eds.), Springer-
607 Verlag, Berlin, pp. 1711-1742.

608 Oesser, S., Seifert, J., 2003. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in
609 bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* 393–399.
610 <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0702-8>

611 Olson, K.E., Sorrells, K.M., 2001. Thermophilic Flat Sour sporeformers. In:
612 Apha– American Public Health Association. *Compendium of methods for the*
613 *microbiological examination of foods*. 4a ed. Cap. 25. Washigton, DC.

- 614 Pacheco, J.V.F., 2005. Curtumes. São Paulo: CETESB, Available in:
 615 <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>.
- 616 Pacheco-Sanchez, C., 2005. Ocorrência de *Bacillus cereus*, Avaliação de sua resistência
 617 térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT. UNICAMP.
- 618 Pirttijärvi, T.S.M., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2000. Properties of *Bacillus*
 619 *cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. Int. J.
 620 Food Microbiol. 60, 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00313-5)
- 621 Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., López
 622 de León, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D.,
 623 Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A.,
 624 Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the
 625 industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus*
 626 species. Genome Biol. 5, R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- 627 Reyes, A.F., 2008. Esporulados E Indicadores Em Requeijão Cremoso. UNICAMP. Available
 628 in: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255404>
- 629 Rosenkvist, H., 1995. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in
 630 wheat bread and raw materials for bread production. Int. J. Food Microbiol. 26, 353–363.
 631 [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00147-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00147-X)
- 632 Salkinoja-Salonen, M.S., 1999. Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food
 633 Poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4637–4645.
- 634 Sagma - Associação dos fabricantes de gelatina da América do Sul. Access in 20 nov.
 635 2018. Gelatina. Available in <http://www.sagma-gelatina.com/>.
- 636
- 637 Schrieber, R., Gareis, H., 2007. Gelatine Handbook, Nutrition. Weinheim: Wiley-VCH GmbH,
 638 345p. <https://doi.org/10.1002/9783527610969>
- 639 Sharma, A., Dour, P., Gupta, P., 2006. Screening of Enterobacterial Contamination During
 640 Gelatin Production and its Effect on Pharmaceutical Grade Gelatin. World J. Microbiol.
 641 Biotechnol. 22, 1049–1054. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-4352-8>
- 642 Sousa, C.P. 2006. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do
 643 grupo coliforme com o uso dos indicadores de qualidade de alimentos. Rev. APS 9, 83–88.
- 644 Stadhouders, J. 1992. Taxonomy of *Bacillus cereus*. Bull. International Dairy
 645 Federation, n. 275, p. 4 – 8.
- 646 Tode, S. “The GELITA Story”. 2003. Hamburg. Verlag Hanseatischer Merkur.
- 647 Turnbull, P. C. B., and J. M. Kramer. 1995. *Bacillus*, p. 349–356. In P. R.

648 Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.),
649 Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology,
650 Washington, D.C

651 Weishardt. Applications. Access in 23 jan. 2014. Available in:
652 <http://www.weishardt.com/en/index.php?applications&whstl=gel&whmenu=smenu3>

653 Zeigler, D.R., 2001. The Genus *Geobacillus*: Introduction & Strain Catalog. *Bacillus Genet.*
654 *Stock Cent. Cat. Strains*, Vol. 3 27.

655 Ziegler, F.L., 2006. Desenvolvimento de um Produto Dietético Funcional para Idosos
656 Funcional para Idosos. UNICAMP.

657 Zhou, P., Regenstein, M., 2007. Comparison of Water Gel Desserts from Fish Skin and Pork
658 Gelatins Using Instrumental Measurements. *Food Chemistry* 102, 196–201.
659 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.00320.x>

660

661

662

CAPÍTULO 2

Concentração e identificação molecular de micro-organismos esporulados isolados das etapas do processamento da gelatina

Artigo formatado de acordo com as diretrizes da revista: "*International Journal of Food Microbiology*"

Concentração e identificação molecular de micro-organismos esporulados isolados das etapas do processamento da gelatina

Graziele Cristina Stradiotto, Alexandra Aysha Isabel Alva Chinha, Anderson de Souza Sant'Ana

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP-Brasil

ABSTRACT

Gelatine is a natural protein, soluble in water, extracted from animal collagen through thermal and chemical treatment. Its physicochemical properties, such as viscosity, gelling power, melting point at 35°C, allow its application in various segments of the food and pharmaceutical industry. The guarantee of its microbiological quality is essential for the maintenance of its properties and innocuousness of the products that use it as raw material. In this work we analyzed the concentrations of four groups of spore forming microorganisms (Mesophilic Anaerobes, Mesophilic Aerobes, Thermophilic Aerobes and *Bacillus cereus*) in all steps of gelatin processing, from the raw material to the final product, in 600 samples of one plant of the company located in the state of São Paulo, the molecular identification of the isolated microorganisms was made by sequencing the 16S gene. Significant differences (ANOVA, PLS-DA) were observed in the concentrations of the groups with the process phases and during the seasons. The highest decimal reduction in the counts for mesophilic aerobes was $\gamma = -1.93$ (extrusion for the final product), of thermophilic aerobes was $\gamma = -2.17$ (alkaline treatment for washing), *Bacillus cereus* was $\gamma = -3.07$ (concentrated tank for sterilization) and mesophilic Anaerobes $\gamma = -1.08$ (concentrated tank for sterilization). Sequencing has identified the presence of members of the *Bacillus cereus* group, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, which are of great importance to industry knowledge because some produces toxins that are harmful to humans and are responsible for deterioration of the product through the production of gelatinases.

Keywords: protein, bacterial spores, raw material, 16S sanger sequencing

59 **Highlights**

- 60 -Análise de 600 amostras de todas as etapas da cadeia produtiva da gelatina;
61 -Reduções decimais em etapas do processamento de diferentes estações do ano;
62 -Identificação de *Bacillus* de grande importância para o conhecimento da indústria;
63 - Impacto na formulação de alimentos à base de gelatina.

1.INTRODUÇÃO

A gelatina é obtida pela degradação química e térmica do colágeno derivado do tecido conjuntivo animal e tem uma propriedade única de se ajustar a baixas temperaturas em um gel termorreversível, que tem um ponto de fusão muito baixo, em torno de 35 a 40°C (Sharma et al., 2006; Stevens, 1992). A interação da sequência de aminoácidos das moléculas de gelatina com fatores externos como pH, força iônica, temperatura e conteúdo de sais no ambiente propicia algumas propriedades funcionais como: formação de gel, texturização, espessante, formação e estabilidade de emulsões, formação de filmes, formação e estabilização de espumas, adesão e coesão, etc. (Schrieber and Gareis, 2007). Além da aplicação na produção de filmes fotográficos, em papéis para revelação de fotos, na formulação de cremes hidratantes, cremes anti-rugas, em tintas para coloração de cabelos, shampoo, condicionador, a gelatina é abundantemente aplicada na produção de cápsulas, na formulação de expansor plasmático, supositórios e excipientes de outros medicamentos. A gelatina também desempenha importante papel na indústria alimentícia compondo doces, gomas, produtos de confeitaria, lácteos, produtos cárneos embutidos, sobremesas e atuando como clarificante de sucos e vinhos. Devido à ampla aplicação da gelatina na fabricação de alimentos e fármacos, o conhecimento da ecologia microbiana e um eficiente controle microbiológico do produto é de extrema importância para garantir a qualidade e segurança dos produtos elaborados com esta matéria-prima (Sagma, 2018; Weishardt, 2014).

Comercialmente as matérias-primas mais utilizadas para extração da gelatina são couro bovino, suíno e a osseína de ambos os animais, mas pode-se também produzir gelatina a partir de frango e peixe (Djagny et al., 2001; Karim and Bhat, 2009). A grande oferta de couro bovino faz com que esta seja a principal fonte de matéria-prima para extração da gelatina em nosso país (IEPEC, 2015). O couro animal, devido ao seu contato direto com o ambiente externo, é fonte de diversos microrganismos. Estudos demonstram que o couro bovino, utilizado como matéria-prima para produção de gelatina, apresenta elevados valores de contagens de aeróbios mesófilos viáveis, 6,2 a 10,5 log₁₀ UFC/cm² (Gill et al., 2000), 1,972 log₁₀ UFC/cm² (Jericho et al., 1998), 1,86 log₁₀ UFC/cm² (Gill et al., 2003).

A contaminação de plantas industriais e produtos alimentícios com bactérias esporuladas é um grande problema, pois estes micro-organismos apresentam ampla versatilidade nutricional, de pH e temperaturas devido a presença de endósporos muito resistentes ao calor, produtos químicos, irradiação e dessecação (Clerck et al., 2004; Setlow, 1994). Devido as condições durante a produção e um tratamento UHT final espera-se que a

carga bacteriana seja bastante reduzida nos extratos semifinais de gelatina, entretanto alguns grupos de bactérias esporuladas podem ser encontradas como em um processo de produção de gelatina na Bélgica onde encontraram a presença de *Bacillus licheniformis*, membros do grupo de *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus fumarioli*, *Bacillus badius*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus agri*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, e *Paenibacillus cookii* (De Clerck and De Vos, 2002). Geralmente não existem procedimentos adicionais que diminuam a contaminação do produto final da gelatina e alguns desses contaminantes podem ser patogênicos para humanos e representar uma ameaça à saúde humana em aplicações alimentícias e farmacêuticas. Alguns contaminantes podem exibir atividade de gelatinases e afetar a qualidade e viscosidade da gelatina (Clerck et al., 2004). Para preservar as propriedades físico-químicas da gelatina, a etapa de esterilização não pode ser estendida (geralmente 140°C/5-12s) para impedir completamente a sobrevivência de esporos bacterianos.

No presente trabalho analisou-se todas as etapas da cadeia de produção da gelatina (matéria-prima, pré-lavagem, tratamento alcalino, lavagem, extração, centrifugação, filtração, ultrafiltração, deionização, evaporação, tanque concentrado, esterilização, extrusão e produto final) quanto a concentração de micro-organismos esporulados em diferentes estações do ano, o isolamento e identificação através do gene 16S das espécies contaminantes em todo o processo, relacionando com o impacto que estes apresentam na formulação de alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coletas

As coletas foram realizadas em uma unidade produtora de gelatina situada no estado São Paulo. Foram feitas durante os meses de fevereiro, março, maio, setembro, novembro de 2016 e Janeiro/2017; 100 amostras foram coletadas em cada mês e enviadas para o laboratório de microbiologia quantitativa de alimentos (LMQA) da FEA-UNICAMP. Totalizando-se 600 amostras no final das coletas. Os seguintes pontos foram amostrados:

- Matéria prima> pedaços ou moído (10 carregamentos diferentes/coleta).
- Após a pré-lavagem (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após tratamento alcalino (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após lavagem (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após extração (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após centrifugação (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);

- Após primeira e segunda filtração (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após Ultrafiltração (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após deionização (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após primeira e segunda evaporação (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Tanque concentrado (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após esterilização (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após extrusão (5 amostras por coleta; 100g ou 100mL);
- Após secagem (produto final): 30 lotes diferentes.

As amostras coletadas foram analisadas quanto a presença de micro-organismos esporulados aeróbios (mesófilos e termófilos), anaeróbios (mesófilos e termófilos) e *Bacillus cereus* de acordo com as metodologias preconizadas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes *et al.*, 2001).

2.2. Determinação da Ocorrência e Concentração de Micro-organismos Esporulados na Cadeia Produtiva da gelatina

Antes do preparo das amostras para as análises, estas ficavam em banho maria à 45°C por aproximadamente 15min para dissolução completa da gelatina que estava solidificada devido ao congelamento e posteriormente seguia-se a pesagem; 10g de cada amostra foram pesadas em sacos plásticos estéreis e eram adicionados 90ml de água destilada estéril. As amostra então foram massageadas com as mãos para completa dissolução da gelatina sendo que algumas mais geleificadas precisavam retornar ao banho maria. Nas amostras de produto final 0,15g da enzima papaína (PROZYN) foram adicionados para a dissolução da amostra. As amostras completamente dissolvidas foram então transferidas para 3 tubos de ensaio estéreis (20ml) seguindo-se para então para choques térmicos específicos para os grupos analisados (Aeróbios Mesófilos, Termófilos e *Bacillus cereus*) e 20ml de cada amostra foram distribuídos em uma série de 6 tubos com meio específico para análises de anaeróbios mesófilos. As contagens foram expressas em LogUFC/g para aeróbios mesófilos, termófilos e *Bacillus cereus* e LogNMP/g para anaeróbios mesófilos.

2.2.1. Contagem e Isolamento de Aeróbios Mesófilos esporulados

Os tubos contendo as amostras foram levados ao banho maria para o choque térmico de 80° C por 30 minutos para ativação dos esporos e posteriormente resfriados em banho de gelo. Seguindo-se então para o plaqueamento *Pour plate* com meio TGE (ágar, triptona, glicose, extrato de carne- KASVI). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48h. As colônias crescidas foram contadas e repicadas em placas de ágar nutriente (KASVI) para purificação, incubadas novamente a 37°C por 24/48h e então transferidas para os criotubos contendo caldo TSB (DIFCO), os quais foram incubados nas mesmas condições, após incubação foram adicionados 0,3ml de glicerol e então foram mantidos congelados em freezer.

2.2.2. Contagem e Isolamento de Aeróbios Termófilos esporulados

Os tubos contendo as amostras foram levados ao banho de óleo para o choque térmico de 110° C por 10 minutos para ativação dos esporos e posteriormente resfriados em banho de gelo. Seguindo-se então para o plaqueamento *Pour plate* com meio DTA – agar (ACUMEDIA), dextrose (VETEC), triptona (KASVI), púrpura de bromocresol (DINÂMICA). As placas foram incubadas em estufa a 55°C por 48/72h. As colônias crescidas foram contadas e repicadas em placas de ágar nutriente (KASVI) para purificação, incubadas novamente a 55°C por 48/72h e então transferidas para os criotubos contendo caldo TSB (DIFCO), os quais foram incubados nas mesmas condições, após incubação foram adicionados 0,3ml de glicerol e então foram mantidos congelados em freezer.

2.2.3. Contagem e Isolamento de *Bacillus cereus*

Os tubos contendo as amostras foram levados ao banho maria para o choque térmico de 80° C por 10 minutos para ativação dos esporos e posteriormente resfriados em banho de gelo. Seguindo-se então para o plaqueamento *Spread plate* em placas com meio MYP(Mannitol Yolk Polymyxin Agar-ACUMEDIA). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24/48h. As colônias crescidas foram contadas e repicadas novamente em placas de MYP para purificação, incubadas novamente a 30°C por 24/48h e então transferidas para os criotubos contendo caldo TSB (DIFCO), os quais foram incubados nas mesmas condições, após incubação foram adicionados 0,3ml de glicerol e então foram mantidos congelados em freezer.

2.2.4. Contagem e Isolamento de Anaeróbios Mesófilos esporulados

As amostras foram transferidas para tubos contendo o meio Pe2 (previamente desaerados com ervilhas secas e submetidos à fervura por 15min). Foram utilizados 6 tubos de Pe2-Peptona(ACUMEDIA), extrato de levedura (ACUMEDIA), Púrpura de bromocresol (DINÂMICA)- e nestes adicionados 3,3ml da amostra; levados então ao choque térmico de 100°C por 20 minutos em uma panela com água fervente, resfriados em banho de gelo e posteriormente encubados a 37°C por 7 dias. Os tubos com alteração de cor, produção de gás ou biomassa foram contados como positivos e repicados em placas com meio TPGY (triptona, peptona, glicose, extrato de levedura) as quais foram encubadas em jarras de anaerobiose a 37°C por 5 a 7 dias. As placas com crescimento foram então repicadas em criotubos com caldo RCM(extrato de levedura, extrato de carne, peptona, glicose, amido soluvel, cloreto de sódio, acetato de sódio, cloridrato de cisteína, ágar) e adicionou-se 1 gota de óleo mineral estéril para gerar anaerobiose. Os criotubos foram encubados a 37°C por 5/7 dias e os que houve crescimento foram adicionados 0,3ml de glicerol e levados ao freezer para manterem-se congelados.

2.3. Identificação dos Isolados por Sequenciamento de 16S rRNA

2.3.1. Extração de DNA

Ajustando os protocolos de extração de DNA (Goldenberger et al., 1995; Heyndrickx et al., 1996; Pitcher et al., 1989), 53 isolados foram ativados em placas de ágar nutriente e após crescimento (24-48h) estas foram transferidas para eppendorfs com 95uL de água estéril livre de Dnases acrescidos de 4uL de lisozima e mantidos por 15min a temperatura de 37°C, em seguida adicionou-se 1 uL de proteinase k e foram levados ao aquecimento de 58°C por 60 min e 95°C por 6 min; foi feito um banho de gelo por 15min e então centrifugadas por 14000 rpm por 5min. Os sobrenadantes (DNA) foram então transferidos para eppendorfs limpos e as concentrações medidas em pela técnica de Nanodrop.

2.3.2. Amplificação do gene 16S e sequenciamento

O protocolo utilizado na PCR para o preparo do mix foi adaptado do (Devereux and Willis, 1995); utilizou-se o Kit de taq polimerase da Cellco®, dntps da Sinapse® e primers da Sigma®. Os primers utilizados foram 8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1100R: AGGGTTGGGGTGGTTG (Turner et al., 1999). As reações contendo 2 uL de DNA, 1,5uL

de cada primer, 2,5uL de buffer, 0,5uL de dntps, 0,2uL de taq polimerase, completados com água livre de dnases e levados ao termociclador com as condições citadas por (Devereux and Willis, 1995). A eletroforese foi feita em gel de agarose 1% para visualização das bandas de 1092pb. Os produtos de PCR obtidos foram então purificados utilizando-se o kit *Easy Pure*® e levados para o sequenciamento no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas (CBMEG). As sequências resultantes foram analisadas em software apropriado (Bioedit e Chromas) e os contigs comparados a sequências similares encontradas no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando o site BLAST. Somente isolados cujas sequências de 16S rRNA apresentaram similaridades $\geq 97\%$ com as sequências das bases de dados foram consideradas pertencentes a uma determinada espécie (Stackebrandt and Goebel, 1999).

2.3.3. Análise estatística

Utilizou-se o modelo PLSDA (Análise discriminante parcial por mínimos quadrados) comparando a influência das estações e etapas do processo sobre as contagens microbianas e ANOVA (teste de Tukey e Fisher) com 95% de confiança.

3. Resultados

3.1 Análise descritiva dos dados de contagem e redução decimal

Os grupos de micro-organismos esporulados (aeróbios mesófilos, *B.cereus*, aeróbios termófilos, anaeróbios mesófilos) foram analisados quanto as suas contagens para as amostras de todas as etapas do processo coletadas nos respectivos meses: fevereiro/2016, março/2016, maio/2016, setembro/2016, novembro/2016 e janeiro/2017. Estes foram agrupados em 3 estações: verão (janeiro e fevereiro), outono (março e maio) e primavera (setembro e novembro). As contagens foram feitas com base no teor de sólidos totais de gelatina presente em cada uma das etapas considerando-se 1g de sólido.

3.1.1. Aeróbios mesófilos: Contagem e Redução decimal

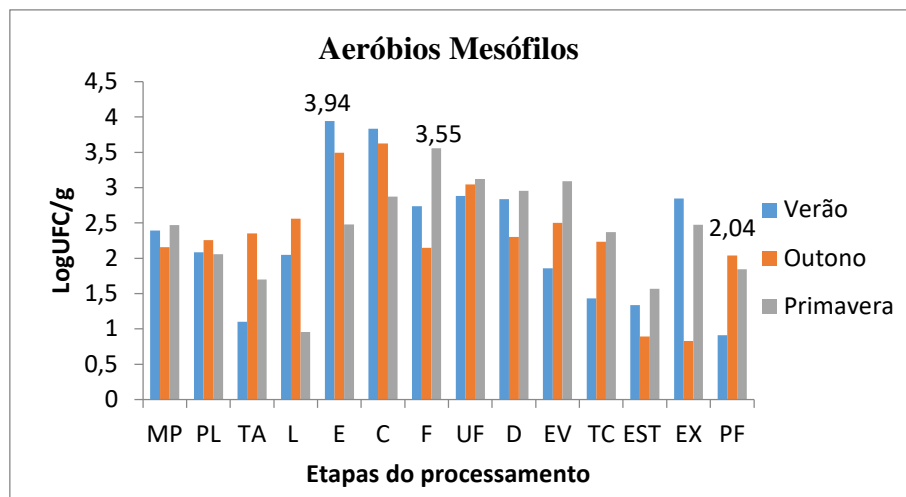


Fig.1. Contagem de aeróbios mesófilos esporulados nas etapas do processo da gelatina

Considerando-se os dados de balanço de massas e o teor de sólidos de gelatina em cada uma das etapas, as constagens de aeróbios mesófilos em 1g de sólido apresentaram pico na etapa de extração (3,94 logUFC/g) e centrifugação (3,83 logUFC/g) nos meses de verão, entretanto, este valor diminui no decorrer do processo com o produto final apresentando contagens de 0,91 logUFC/g. Observou-se que da etapa de lavagem (Verão) para extração houve um aumento de 1,89 Log nas contagens e que o maior valor de redução se dá da etapa de extrusão para o produto final com um valor de $\gamma = -1,93$, ou seja, quase redução de 2 logs na contagem de uma etapa para outra (Fig.1).

Para os meses da estação outono (março e maio), observou-se uma concentração de 3,62 logUFC/g na etapa de centrifugação, com base no teor de sólidos totais, ocorrendo uma redução destes esporulados já na esterilização e extrusão (0,83logUFC/g), entretanto, esta concentração aumenta no produto final (2,04logUFC/g). Analisando-se os valores de redução decimal (γ) nas etapas do processo para os meses de outono, a maior redução ocorreu da etapa de centrifugação para a de filtração, com diminuição de $\gamma = -1,47$ log da concentração; houve redução do tanque concentrado para a esterilização de $\gamma = -1,34$ log e aumento na contagem de 1,21 log da extrusão para o produto final.

Já nos meses de primavera (setembro e novembro), observou-se um pico de concentração de 3,55 logUFC/g na etapa de filtração, já diminuindo na etapa de esterilização com 1,56 logUFC/g e o produto final apresentou um valor de 1,84log UFC/g. Observou-se que da etapa de lavagem para a extração é onde ocorreu o maior aumento decimal de $\gamma = 1,52$ e o maior valor de redução ocorreu da etapa de tanque concentrado para a de esterilização com $\gamma = -0,80$.

A tabela 1 mostra os valores de reduções decimais mínimo, médio e máximo nas etapas do processo considerando-se as três temporadas ao longo do ano; em relação aos valores de redução decimal máximo a etapa que apresentou a maior redução foi a de extrusão para o produto final ($\gamma = -1,93$), a qual foi na estação de verão. Já o valor mínimo de redução, ou seja, aumento decimal, foi de $\gamma = 1,89$ da etapa de lavagem para extração, a qual também ocorreu na estação verão.

Tabela 1. Redução decimal nas três temporadas para aeróbios mesófilos esporulados

Etapas	Nº de reduções (γ)		
	Mínimo	Médio	Máximo
MP	0,09	-0,16	-0,41
PL	0,09	-0,44	-0,98
TA	0,94	0,1	-0,74
L	1,89*	1,41	0,93
E	0,39	0,14	-0,11
C	0,68	-0,39	-1,47
F	0,89	0,23	-0,43
UF	-0,04	-0,39	-0,74
D	0,19	-0,39	-0,98
EV	-0,26	-0,48	-0,71
TC	-0,09	-0,71	-1,34
EST	1,51	0,72	-0,06
EX	1,21	-0,36	-1,93*

3.1.2. Aeróbios termófilos: Contagem e Redução decimal

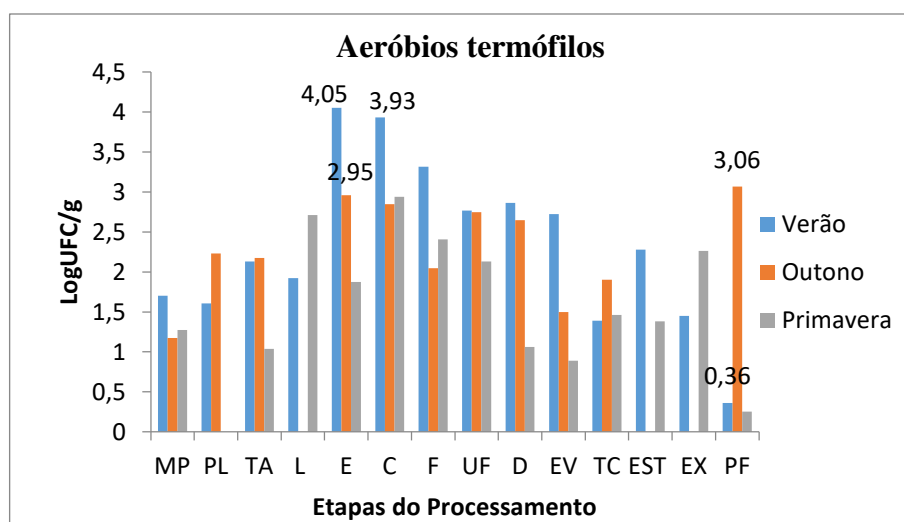


Fig.2. Contagem de aeróbios termófilos esporulados nas etapas do processo da gelatina

Nas contagens dos meses de verão para o grupo de aeróbios termófilos, considerando-se o teor de sólidos totais em cada etapa, as que apresentaram as maiores contagens foram a etapa de extração (4,05 log UFC/g) e a etapa de centrifugação (3,93logUFC/g). A contagem diminui ao longo do processo com valores de 2,28 logUFC/g na etapa de esterilização, o qual é reduzido até valores mínimos no produto final (0,36 logUFC/g). Observou-se um aumento decimal de $\gamma = 2,12$ logs da etapa de lavagem para extração e reduções decimais de $\gamma = -1,33$ da evaporação para tanque concentrado e de $\gamma = -1,09$ da extrusão para o produto final (Fig. 2).

No outono (março e maio), as maiores contagens de aeróbios termófilos foram observadas no produto final com um valor de 3,06 logUFC/g. Observou-se valores mínimos ao longo do processo, como reduções de $\gamma = -2,17$ do tratamento alcalino para lavagem e de $\gamma = -1,90$ do tanque concentrado para a esterilização. Ocorre um aumento de $\gamma = 2,95$ da etapa de lavagem para a extração e após a extrusão a contagem também aumenta de 3logs no produto final. Na primavera (setembro e novembro), foram observadas altas contagens nas etapas de lavagem (2,71logUFC/g) e centrifugação (2,94logUFC/g) (Fig.2). As reduções decimais já ocorrem da matéria-prima para a pré lavagem $\gamma = -1,27$, entretanto, após tratamento alcalino ocorreu um aumento decimal de 1,67log para a etapa de lavagem. A maior redução decimal se dá da etapa de extrusão para o produto final com valor de $\gamma = -2$ logs nas contagens.

Considerando-se as três temporadas, a maior redução decimal ocorreu na estação de outono da etapa de tratamento alcalino para lavagem ($\gamma = -2,17$) e o maior aumento decimal também ocorreu na estação outono da etapa de extrusão para produto final $\gamma = 3,06$ logs. (tabela 2).

Tabela 2. Redução decimal nas três temporadas para aeróbios termófilos esporulados

Etapas	Nº de reduções (γ)		
	Mínimo	Médio	Máximo
MP	1,05	-0,11	-1,27
PL	1,03	0,49	-0,05
TA	1,67	-0,25	-2,17*
L	2,95	1,06	-0,83
E	1,06	0,47	-0,12
C	-0,53	-0,66	-0,79
F	0,69	0,07	-0,55
UF	0,09	-0,48	-1,06
D	-0,14	-0,64	-1,14
EV	0,57	-0,38	-1,33
TC	0,89	-0,50	-1,9
EST	0,88	0,03	-0,82
EX	3,06*	0,53	-2

3.1.3. *Bacillus cereus*: Contagem e Redução decimal

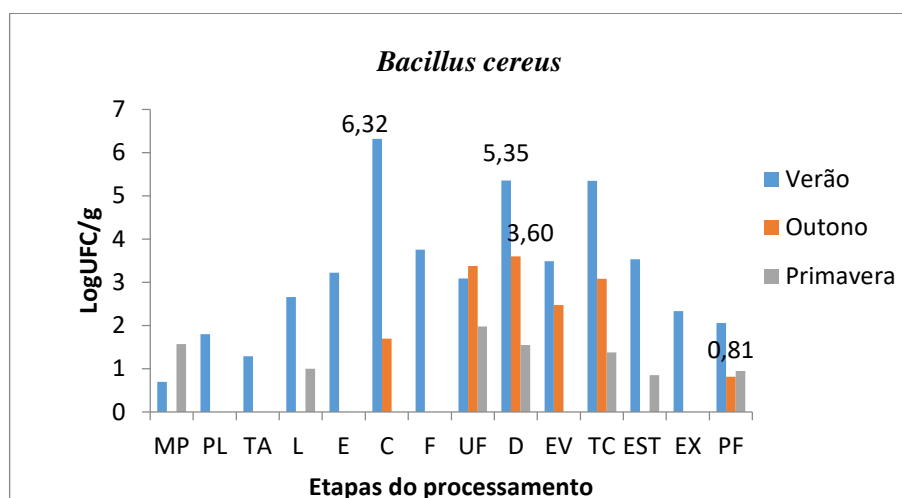


Fig.3. Contagem de *Bacillus cereus* nas etapas do processo da gelatina

As contagens de *Bacillus cereus* variaram muito tanto de uma etapa para outra (todas as contagens foram feitas considerando 1g de sólidos de gelatina) (Fig.3), quanto nas três estações estudadas, algumas etapas apresentaram “zero” contagens, como a pré-lavagem, tratamento alcalino e extração nas estações de outono e primavera e algumas apresentaram picos de contagem como a centrifugação no verão (6,32logUFC/g) e deionização (5,35logUFC/g) também no verão. Nos meses de janeiro e fevereiro (verão) observou-se maior redução decimal da etapa de centrifugação para filtração ($\gamma = -2,56$) e da etapa de deionização para evaporação ($\gamma = -1,86$); já da etapa de extração para centrifugação, ocorreu um aumento decimal de $\gamma = 3,09$ logs.

Durante os meses da estação outono, as maiores contagens foram nas etapas de ultrafiltração (3,37 logUFC/g) e deionização (3,60 logUFC/g), com as etapas iniciais apresentando “zero” contagens e o produto final com 0,81logUFC/g. A maior redução decimal ocorre da etapa de tanque concentrado para esterilização ($\gamma = -3,07$) e o aumento decimal se dá da etapa de lavagem para extração ($\gamma = 1,69$).

Na primavera as maiores contagens são na ultrafiltração (1,97 logUFC/g), deionização (1,55 logUFC/g) e matéria-prima (1,56 logUFC/g), algumas etapas apresentaram “zero” e o produto final com 0,94logUFC/g. A maior redução decimal ocorre da etapa de deionização para evaporação ($\gamma = -1,55$) e um aumento decimal ocorre da etapa de filtração para ultrafiltração ($\gamma = 1,97$).

Analisando os valores das três temporadas em relação as reduções decimais, a máxima redução foi da etapa de tanque concentrado para esterilização ($\gamma = -3,07$) para os meses de outono e a mínima redução (aumento decimal) é da etapa de filtração para ultrafiltração com aumento de 3,37 logs também nos meses de outono (tabela 3).

Tabela 3. Redução decimal nas três temporadas para *Bacillus cereus*

Etapas	N° de reduções (γ)		
	Mínimo	Médio	Máximo
MP	1,09	-0,23	-1,56
PL	0	-0,25	-0,5
TA	1,37	0,68	0
L	0,55	-0,22	-1
E	3,09	1,54	0
C	0	-1,28	-2,56
F	3,37*	1,35	-0,66
UF	2,26	0,92	-0,42
D	-1,12	-1,49	-1,86
EV	1,85	1,22	0,6
TC	-0,52	-1,79	-3,07*
EST	0	-0,59	-1,19
EX	0,94	0,33	-0,27

3.1.4. Anaeróbios mesófilos: Contagem e Redução decimal

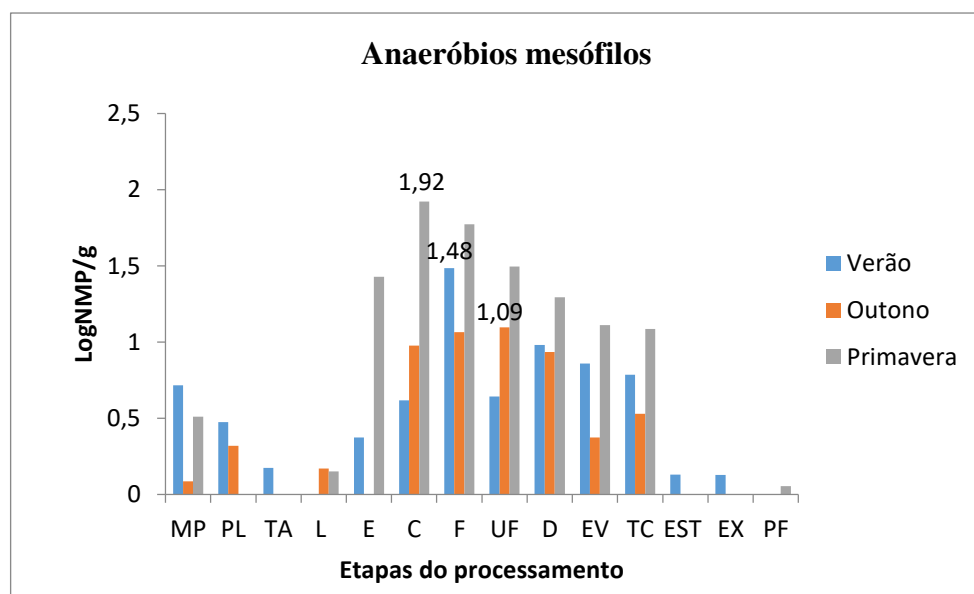


Fig.4. Contagem de Anaeróbios mesófilos nas etapas do processo da gelatina

Nas contagens de anaeróbios mesófilos para os meses de verão, verificou-se maior contagem na etapa de filtração (1,48 logNMP/g) e “zero” contagens na etapa de lavagem e produto final (Fig.4). A maior redução decimal ocorreu da etapa de filtração para a de ultrafiltração ($\gamma = -0,84$) e um aumento decimal ocorre da etapa de centrifugação para filtração ($\gamma = 0,86$). Na estação outono as maiores contagens são nas etapas de filtração (1,06logNMP/g) e ultrafiltração (1,09logNMP/g). A maior redução decimal ocorre da deionização para evaporação ($\gamma = -0,56$) e o maior aumento ocorre da extração para centrifugação ($\gamma = 0,97$).

Já nos meses de primavera, as maiores contagens são encontradas nas etapas de centrifugação (1,92logUFC/g), filtração (1,77logUFC/g) e ultrafiltração (1,49logUFC/g) e menores contagens nas etapas iniciais e finais do processamento com o produto final apresentando 0,05logNMP/g. Da etapa de tanque concentrado para a esterilização ocorreu a maior redução decimal $\gamma = -1,08$ e da etapa de lavagem para extração ocorreu o maior aumento de $\gamma = 1,27$.

As contagens das três estações comparadas em relação as reduções máxima, média e mínima nas etapas de processo são mostradas na tabela 4, onde a máxima redução foi de $\gamma = -1,08$ da etapa de tanque concentrado para esterilização na estação primavera e a mínima redução ou aumento decimal ocorreu da etapa de lavagem para extração ($\gamma = 1,27$) também nos meses de primavera.

Tabela 4. Redução decimal nas três temporadas para Anaeróbios mesófilos

Etapas	Nº de reduções (γ)		
	Mínimo	Médio	Máximo
MP	0,23	-0,14	-0,51
PL	0	-0,14	-0,29
TA	0,17	0	-0,17
L	1,27*	0,55	-0,17
E	0,97	0,60	0,24
C	0,86	0,35	-0,15
F	0,03	-0,40	-0,84
UF	0,33	0,06	-0,2
D	-0,12	-0,34	-0,56
EV	0,15	0,04	-0,07
TC	-0,52	-0,8	-1,08*
EST	0	-0,00049	-0,00097
EX	0,05	-0,03	-0,12

3.2. Análise estatística dos dados

3.2.1.PLS-DA

Utilizou-se o modelo PLS-DA- Análise discriminante por mínimos quadrados parciais- considerando etapas e estação do ano, para verificar dentro dessas variáveis qual grupo microbiano se destacava. Neste modelo as variáveis são: R^2X que representa os grupos microbianos, R^2Y que representa as etapas do processo ou estação do ano e Q^2 é a qualidade do modelo. Quanto mais próximo a 1, mais perfeito o modelo, entretanto, como contagens microbianas são probabilísticas, a qualidade do modelo nem sempre sairá perfeita. Os resultados VIPs (variable importance in the projection) maiores e próximos a 1 são os que apresentam relevância e estão marcados com*(tabela 5).

Tabela 5. Análise PLS-DA para Etapas do Processo

Variable	VIP	Standard deviation	Lower bound(95%)	Upper bound(95%)
Anaerobios mesófilos	1,356*	0,034	1,262	1,450
Aeróbios mesofilos	1,127*	0,076	0,917	1,337
Aeróbios termofilos	0,790	0,057	0,632	0,947
<i>B cereus</i>	0,516	0,061	0,348	0,684

Na primeira análise comparou-se os grupos microbianos com as etapas do processamento da gelatina e foi observado que o grupo de anaeróbios mesófilos seguido pelo grupo de aeróbios mesófilos foram significativamente relevantes, ou seja, eles variaram ao longo do processo, seja reduzindo ou aumentando as suas contagens devido as “interferências” ocasionadas em cada uma das etapas, por exemplo, variação de temperatura e pH, filtros e membranas de celulose contaminadas, resinas contaminadas. Os grupos de Aeróbios termófilos e *B. cereus* não apresentaram variação significativa (Fig.5).

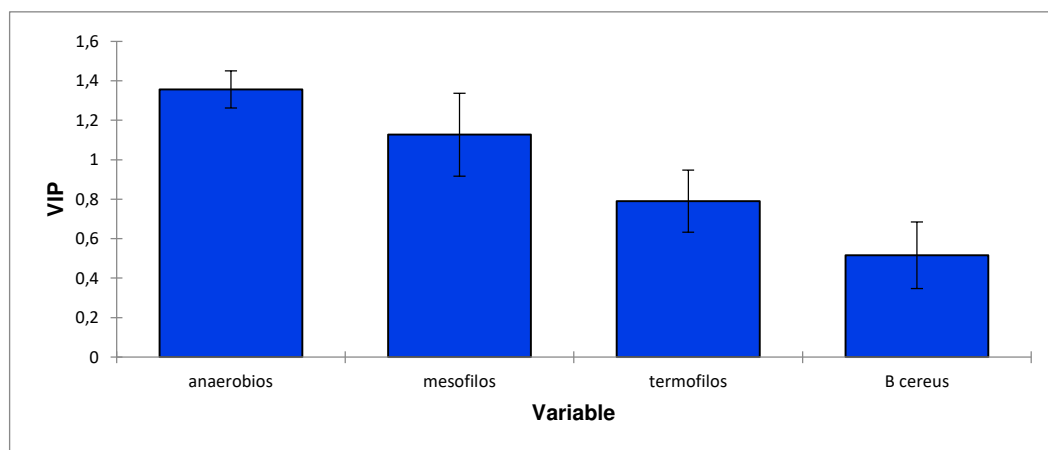


Fig.5. Resultados VIPs de Grupos microbianos x Etapas do processo

Na segunda análise, comparou-se a influência das estações do ano (verão, outono, primavera) com as contagens dos grupos microbianos, e obteve-se os seguintes resultados Vips (tabela 6):

Tabela 6. Análise PLS-DA para Estações do ano

Variable	VIP	Standard deviation	Lower bound(95%)	Upper bound(95%)
<i>B. cereus</i>	1,562*	0,139	1,177	1,948
Aeróbios termofílos	1,158*	0,111	0,851	1,465
Anaeróbios mesófilos	0,467	0,161	0,019	0,915
Aeróbios mesófilos	0,015	0,164	-0,440	0,469

Os resultados VIPs maiores que 1* são os que apresentam relevância, ou seja, as estações do ano influenciam na variação destes grupos. O grupo de *B. cereus* seguido pelo grupo de termófilos são os que apresentaram valores significativos, ou seja, estes dois grupos tiveram grande variação em suas contagens ao longo das estações do ano; já as contagens de anaeróbios e mesófilos não têm influência significativa com as estações (Fig.6).

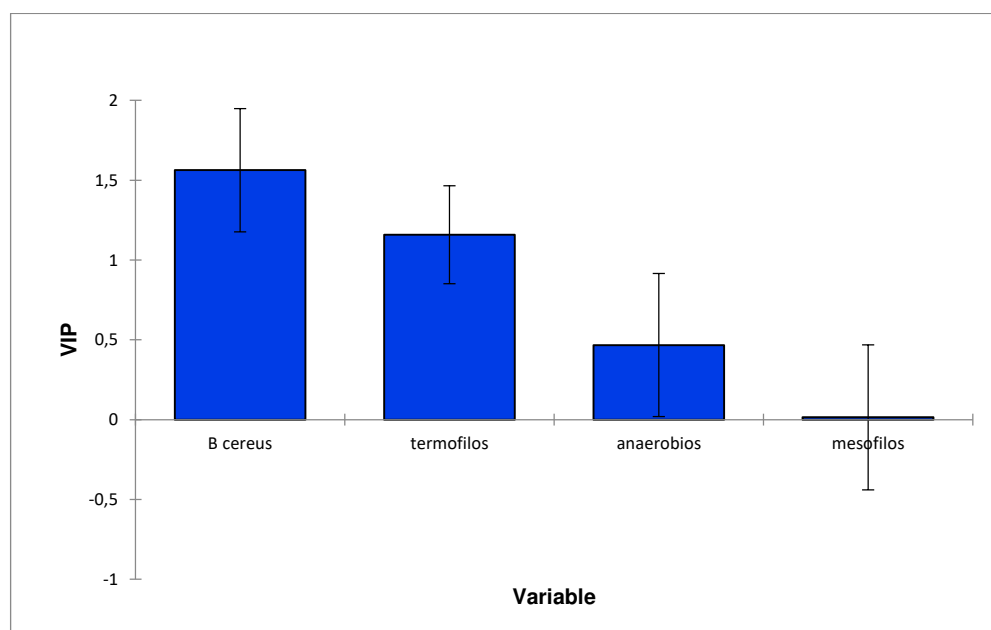


Fig.6. Resultados VIPs de Grupos microbianos x Estação do ano

3.2.2. ANOVA

Utilizou-se a análise a análise variância- testes de Tukey e Fisher - com nível de significância de 95%, comparando-se as contagens dos 4 grupos microbianos com as 14 fases do processo e as 3 estações e obteve-se a seguinte a tabela:

415

Tabela 7. Análise de variância para Etapas do Processo

Etapas	Aeróbios mesófilos	Aeróbios termófilos	Anaeróbios mesófilos	<i>B cereus</i>
Centrifugação	3,021 a	2,214 a	1,047 a	0,732 bcd
Ultrafiltração	2,226 b	1,542 bc	1,008 a	1,377 a
Extração	2,252 b	2,167 ab	0,474 bc	1,019 ab
Filtração	2,086 bc	1,865 abc	1,147 a	0,714 bcd
Deionização	2,213 b	1,443 cd	0,920 a	0,761 abc
Evaporação	1,783 bcd	0,818 de	0,649 b	0,618 bcd
Tq. Concentrado	1,572 cde	0,448 e	0,664 b	0,976 abc
Pre-lavagem	1,358 de	0,652 e	0,183 de	0,394 bcde
Lavagem	1,329 de	0,818 de	0,102 e	0,380 cde
Materia-prima	1,432 de	0,524 e	0,339 cd	0,205 de
Esterilização	0,684 fg	0,780 e	0,067 e	0,640 bcd
Extrusão	1,252 de	0,541 e	0,113 e	0,492 bcde
Trat. Alcalino	1,180 ef	0,551 e	0,090 e	0,156 de
Produto final	0,622 g	0,423 e	0,010 e	0,095 e
Pr > F(Model)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Significant	Yes	Yes	Yes	Yes

Os resultados mostraram que para os 4 grupos ocorreram diferenças significativas nas contagens em cada uma das fases do processo, ou seja, as diferentes variações, sejam de temperatura ou pH, de cada uma das fases têm influência significativa sobre os crescimento dos esporos. Observa-se uma grande variação nas contagens do grupos de anaeróbios mesófilos entre as fases do processamento com maior pico na etapa de filtração (Fig.7).

421

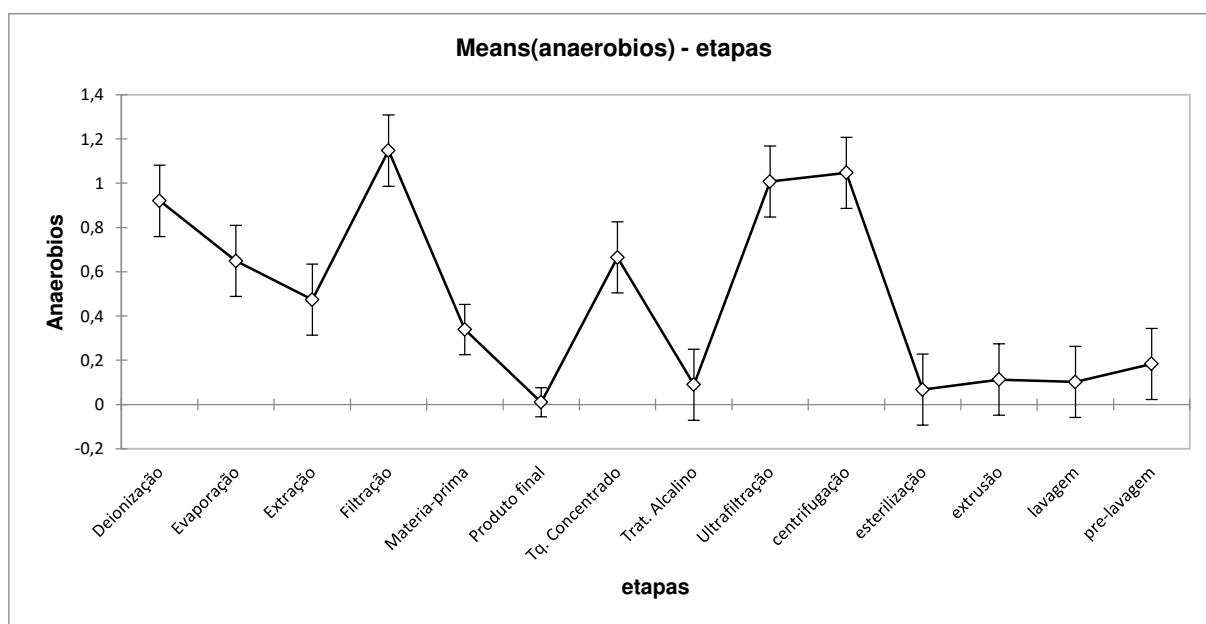


Fig.7. Contagens de Anaeróbios mesófilos nas etapas do processo

422

423

424

Já na comparação com as estações do ano, com exceção do grupo de aeróbios mesófilos (Fig.8), os outros 3 grupos apresentaram diferenças significativas nas contagens (tabela 8).

Tabela 8. Análise de variância para Estações do ano

	Aeróbios mesofilos	Aeróbios Termofilos	Anaerobios mesófilos	<i>B cereus</i>
Verão	1,392 a	1,343 a	0,303 b	1,054 a
Primavera	1,472 a	0,566 b	0,514 a	0,153 b
Outono	1,269 a	0,704 b	0,264 b	0,179 b
Pr>F(Model)	0,278	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Significant	No	Yes	Yes	Yes

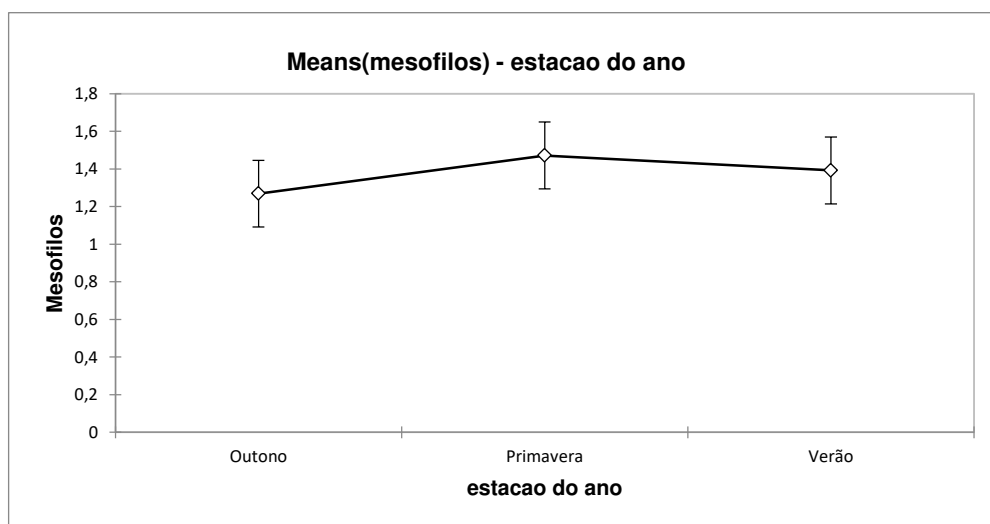


Fig.8. Contagens de Aeróbios mesófilos durante as estações do ano

3.3. Identificação do Isolados

Tabela 9. Identificação dos isolados por sequenciamento do gene 16S RNAr

Etapas do Processo	Espécies identificadas	Código da amostra/mês
Matéria-Prima	<i>Bacillus licheniformis</i>	MP8(T)-Fevereiro
	<i>Bacillus nitratreducens</i>	MP10(M)-Março
	<i>Bacillus cereus</i>	MP5(BC)-Maio
	<i>Clostridium cochlearium</i>	MP5(A)-Janeiro
Pré-lavagem	<i>Lysinibacillus cresolivorans</i>	PL1(M)-Novembro

Tratamento Alcalino	<i>Bacillus licheniformis</i>	TA4(T)-Fevereiro
	<i>Bacillus toyonensis</i>	TA4(BC)-Fevereiro
	<i>Bacillus nitratreducens</i>	TA1(M)-Novembro
	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	TA2(M)-Novembro
Lavagem	<i>Bacillus toyonensis</i>	L2(M)-Novembro
	<i>Bacillus nitratreducens</i>	L5(M)-Janeiro
Extração	<i>Bacillus subtilis</i>	E2(M)-Março
Centrifugação	<i>Bacillus cereus</i>	C1(BC)-Fevereiro
	<i>Bacillus hisashii</i>	C2(A)-Maio
	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	C4(T)-Maio
	<i>Bacillus licheniformis</i>	C1(M)-Novembro
	<i>Brevibacillus agri</i>	C1(T)-Setembro
	<i>Clostridium cochlearium</i>	C2(A)-Janeiro
Filtração	<i>Bacillus proteolityticus</i>	F5(A)-Fevereiro
	<i>Bacillus cereus</i>	F1(M)-Março
	<i>Bacillus hisashii</i>	F4(A)-Março
	<i>Bacillus toyonensis</i>	F2(M)-Novembro
Ultrafiltração	<i>Bacillus licheniformis</i>	UF3(A)-Fevereiro
	<i>Lysinibacillus tabacifoli</i>	UF2(M)-Março
	<i>Geobacillus icigianus</i>	UF3(T)-Maio
	<i>Bacillus licheniformis</i>	UF3(M)-Setembro
Deionização	<i>Clostridium sporogenes</i>	D5(A)-Fevereiro
	<i>Bacillus pacificus</i>	D1(BC)-Fevereiro
	<i>Bacillus tropicus</i>	D3(M)-Maio
	<i>Bacillus nitratreducens</i>	D2(M)-Setembro
	<i>Bacillus badius</i>	D4(M)-Novembro
	<i>Bacillus aerius</i>	D5(A)-Janeiro

Evaporação	<i>Bacillus luti</i>	EV1(A)-Fevereiro
	<i>Bacillus cereus</i>	EV1(BC)-Março
	<i>Bacillus cereus</i>	EV1(M)-Março
	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	EV1(T)-Março
	<i>Brevibacillus gelatini</i>	EVI(M)-Maio
Tanque concentrado	<i>Clostridium cochlearium</i>	TC5(A)-Março
	<i>Clostridium sporogenes</i>	TC5(A)-Janeiro
Esterilização	<i>Brevibacillus nitrificans</i>	EST5(M)-Setembro
	<i>Bacillus subtilis</i>	EST4(BC)-Novembro
Extrusão	<i>Bacillus tropicus</i>	EX3(BC)-Fevereiro
	<i>Bacillus toyonensis</i>	EX3(A)-Fevereiro
	<i>Bacillus nitratreducens</i>	EX4(M)-Setembro
Produto Final	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	PF5(BC)-Fevereiro
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	PF1(T)-Março
	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	PF15(T)-Março
	<i>Brevibacillus gelatini</i>	PF21(M)-Maio
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	PF5(T)-Maio
	<i>Bacillus nitratreducens</i>	PF8(M)-Setembro
	<i>Brevibacillus gelatini</i>	PF12(M)-Setembro
	<i>Bacillus toyonensis</i>	PF16(M)-Novembro
	<i>Bacillus licheniformis</i>	PF17(M)-Janeiro

4. Discussão

O grupo de aeróbios mesófilos foram encontrados ao longo de todo processo produtivo com altas contagens no decorrer dos meses não havendo portanto diferença significativa nas contagens com as estações do ano como mostrado pelas duas análises estatísticas (PLS-DA e ANOVA) utilizadas neste estudo. A variação observada neste grupo ocorreu por influência das fases do processo, observou-se uma maior redução decimal da etapa de extrusão para o produto final ($\gamma = -1,93$) no verão. Após a etapa de extrusão a gelatina passa pelo processo de secagem, onde os secadores alcançam temperaturas de até 80°C por 4h o que contribui para eliminação de possíveis células vegetativas de aeróbios mesófilos. Entretanto, os esporos produzidos por algumas espécies mesofílicas são resistentes e podem sobreviver até o produto final (Sadiq et al., 2016). Além disso, as esteiras que levam a gelatina até os secadores podem transferir micro-organismos devido ao contato direto com a gelatina o que pode estar contribuindo para aumentar a concentração no produto final como foi observado para os meses de outono, onde houve aumento decimal da extrusão para o produto final ($\gamma = 1,21$).

Durante o processo, observou-se que o maior aumento decimal ocorreu da etapa de lavagem para a de extração ($\gamma = 1,89$), na etapa de lavagem a matéria-prima permanece em tanques de madeira por cerca de 25-45h, a madeira apresenta superfície que pode abrigar esporos de micro-organismos e assim transferir para os alimentos (Aviat et al., 2016) (neste caso, a matéria-prima) que posteriormente passará pela etapa de extração, onde diferentes caldos com diferentes concentrações de gelatina, serão obtidos da mesma matéria-prima para extração de todo colágeno e possivelmente esporos resistentes se concentram nesta fase.

O grupo de aeróbios termófilos por apresentarem esporos com alta resistência ao calor estão entre os principais grupos de importância na indústria alimentícia (Kakagianni et al., 2017). Conseguem sobreviver à temperatura de esterilização utilizada no processo de esterilização da gelatina (140°C), por isso apresentou alta contagem nesta etapa sendo ainda encontrados no produto final (3,06logUFC/g). As análises estatísticas tanto PLS-DA quanto a ANOVA mostraram que as estações do ano influenciam significativamente as contagens de aeróbios termófilos, sendo no verão (janeiro e fevereiro) encontradas as maiores contagens. Isto pode estar ocorrendo devido às condições favoráveis (Hoffmann, 2001) para o desenvolvimento de micro-organismos termofílicos presentes na matéria-prima, aumento da temperatura durante o transporte da mesma favorecendo o desenvolvendo de esporos e consequentemente permanência durante as outras fases do processo. Pela análise ANOVA, a

variação de termófilos durante as etapas do processo foi significativa. A maior redução decimal ocorreu do tratamento alcalino para lavagem ($\gamma = -2,17$), no tratamento alcalino as contagens ainda permaneceram altas sendo que uma drástica redução ocorreu após a lavagem, provavelmente devido as mudanças bruscas de pH que caiu de 13 para 1. Entretanto, da lavagem para extração observa-se novamente um aumento decimal, assim como aconteceu para os aeróbios mesófilos. O maior aumento decimal ocorreu da etapa de extrusão para o produto final, observado nos meses de outono, cerca de $\gamma = 3,06$ logs, o qual pode ser explicado devido a alta resistência dos esporos termofílicos (Sadiq et al., 2016) e pelo fato das esteiras de secagem possivelmente estarem contaminadas, os esporos então sobreviveram às temperaturas utilizadas na secagem da gelatina e permanecem no produto final.

O grupo de *Bacillus cereus* é considerado um dos mais importantes contaminantes em alimentos pois além de produzirem toxinas (Carlin et al., 2010) produzem diferentes proteases, incluindo gelatinases que causam a degradação enzimática da gelatina afetando sua viscosidade e, portanto, a qualidade do produto em si e seus derivados (De Clerck and De Vos, 2002). A análise estatística de PLS-DA e a ANOVA mostraram que houve influência das estações do ano nas contagens deste grupo, com maiores contagens nos meses de verão. *Bacillus cereus* cresce à temperatura ótima de 37°C e máxima de 55°C (Mcclure, 2015), portanto, as condições de transporte da matéria-prima em altas temperaturas poderiam ter influenciado a esporulação. A ANOVA mostrou que as etapas do processo influenciaram significativamente as contagens de *Bacillus cereus*. A maior redução decimal ocorreu nos meses de outono da etapa de tanque concentrado para a etapa de esterilização ($\gamma = -3,07$) mostrando que a esterilização foi eficiente na eliminação destes esporos. Entretanto, nos meses de verão, apesar de ter ocorrido redução da esterilização para extrusão, pode-se verificar contagens de 2,06 logUFC/g de *Bacillus cereus* no produto final possivelmente por contaminações nas fases finais (esteiras de secagem). O maior aumento decimal ocorreu da etapa de filtração para ultrafiltração com $\gamma = 3,37$ logs. A gelatina atravessa uma série de filtros de celulose na etapa da ultrafiltração e as polpas de celulose utilizadas devem passar por um crítico processo de recuperação para eliminar as possibilidades de uma transferência de contaminação entre um processo e outro. O intervalo de utilização destas polpas deve ser avaliado considerando a carga microbiana que é capaz de reter-se e tornar-se um ponto de recontaminação. A tubulação onde ocorre a ultrafiltração deve ser monitorada frequentemente para identificação e eliminação de pontos mortos, os quais podem vir a ser grande fonte de contaminação por propiciar o crescimento bacteriano e a formação de biofilmes (Courts, 1977).

Os anaeróbios mesófilos foram encontrados devido ao baixo potencial Redox do couro bovino (Feitosa, 1999) que favorece o crescimento destes micro-organismos. Nas etapas de pré-lavagem, tratamento alcalino e lavagem ocorre uma diminuição na concentração sugerindo que estes foram afetados pela exposição a condições extremas de pH (2 e 4) e temperaturas entre 50 e 90°C. O maior aumento decimal ocorreu da etapa de lavagem para a de extração ($\gamma=1,27$) nos meses de primavera. A partir da etapa de extração até a etapa de tanque concentrado ocorre um aumento da concentração destes micro-organismos. Na etapa de centrifugação ocorre a eliminação apenas de gorduras e fibras e não da carga microbiana que provavelmente se multiplica devido as condições favoráveis destas etapas (baixas concentrações de oxigênio). Na etapa de esterilização o vapor de água aumenta a concentração de oxigênio do ambiente diminuindo a concentração deste grupo nas etapas seguintes. A maior redução decimal foi de $\gamma= -1,07$ que ocorreu da etapa de tanque concentrado para esterilização nos meses da primavera, mostrando eficiência neste processo, entretanto, a concentração volta aumentar da extrusão para o produto final $\gamma= 0,05$ nos meses de primavera. A ANOVA mostrou que houve influência significativa nas contagens de anaeróbios mesófilos com as estações do ano, o que não foi observado no PLS-DA. Já para as fases do processamento, tanto a análise de ANOVA quanto de PLS-DA, mostraram que as contagens são influenciadas significativamente pelas variações que ocorrem no processo.

Dos 53 isolados que foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S RNAr encontramos a presença de integrantes do grupo de *Bacillus cereus*: *Bacillus cereus*, *Bacillus nitratisreducens*, *Bacillus luti*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus tropicus*; com exceção de *Bacillus cereus*, os outros foram recentemente classificados como pertencentes ao grupo por Liu *et al.*(2017) e *Bacillus toyonensis* por Jiménez *et al.*(2013). A presença de *Bacillus cereus* em gelatina pode ser prejudicial pois é um agente causador de infecções tanto gastrointestinais como não-gastrointestinais. Enterotoxinas, toxina emética (cereulida), hemolisinas e fosfolipase C, bem como muitos enzimas como beta-lactamases, proteases e collagenases são conhecidas como potenciais fatores de virulência de *Bacillus cereus* (Kotiranta *et al.*, 2000).

A presença de *B. licheniformis* em gelatina merece atenção pois algumas cepas são produtoras de toxinas e foram associadas a incidentes de intoxicação alimentar (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999); *B. licheniformis* também deve ser considerado como um potencial patógeno em pacientes imunocomprometidos (De Clerck and De Vos, 2002; Blue, S.R. *et al.*, 1995). Como a gelatina é usada em produtos farmacêuticos, este tipo de contaminação é de grande preocupação (De Clerck and De Vos, 2002). No presente trabalho cepas de *Bacillus licheniformis* foram identificadas desde a matéria-prima até o produto final.

Geobacillus stearothermophilus foi isolado e identificado de amostra do produto final; este esporulado não apresenta atividade de gelatinases como foi demonstrado por De Clerck *et al.* (2004) que avaliaram a atividade de gelatinases em *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus* e quase todas as espécies apresentaram capacidade para degradar a gelatina. A degradação enzimática da gelatina afeta a sua viscosidade e portanto, a qualidade do produto em si e suas aplicações. Além disso, devido a essa degradação, nutrientes essenciais podem tornam-se disponíveis para contaminantes negativos para gelatinase, promovendo seu crescimento (Clerck *et al.*, 2004).

Bacillus subtilis, *Bacillus badius*, *Brevibacillus agri* também foram caracterizados no trabalho De Clerck and De Vos (2002); espécies de *Brevibacillus* e *Bacillus subtilis* foram associados em poucos casos de doenças transmitidas por alimentos (De Clerck and De Vos, 2002; Pirttijärvi *et al.*, 2000). *Brevibacillus gelatini* foi caracterizada em amostras de produto final; esta espécie termofílica foi encontrada primeiramente em fontes termais na Turquia e se diferenciava das outras do gênero de *Brevibacillus* por apresentarem o ácido meso-diaminopimélico na parede celular (Inan *et al.*, 2016).

Bactérias anaeróbias estritas do gênero *Clostridium* foram caracterizadas em amostras da matéria-prima e ao longo do processo, entretanto observou-se a ausência deste gênero no produto final. Rodriguez *et al.* (2013) encontraram em amostras de carcassas de bovinos e suínos a contaminação por *Clostridium difficile*; o baixo potencial redox da carne, couro e carcassas pode favorecer o crescimento destes anaeróbios (Feitosa, 1999). *Clostridium sporogenes* e *Clostridium cochlearium* foram encontrados ao longo do processo e são importantes agentes causadores de deterioração em alimentos como demonstrado por Lycken and Borch(2006) em queijos processados.

Espécies do genero *Lysinibacillus* foram encontradas durante o processo e no produto final; estas eram antigamente classificadas como *Bacillus* e foram reclassificadas devido a presença de peptidioglicanos com lisina e ácido aspártico (Ahmed *et al.*, 2007). *Lysinibacillus sphaericus* são conhecidas por serem formadoras de esporos altamente resistentes e por produzirem toxinas inseticidas (Berry, 2012).

As amostras analisadas mostraram que mesmo no produto final encontramos espécies relacionadas à produção de toxinas e algumas que causam a deterioração do produto através das gelatinases, a utilização destas amostras para fins tanto farmacêuticos quanto alimentícios deve ser muito bem avaliada em relação a concentração aceitável, pois poderia ser prejudicial a saúde pelas toxinas presentes e a indústria em relação às perdas econômicas, pela degradação da molécula e perda de suas propriedades físico-químicas como viscosidade e

poder de gelificação. No Brasil as análises exigidas para gelatina são baseadas nas especificações microbiológicas solicitadas pelos clientes. Geralmente estas especificações são baseadas nas legislações que contemplam seu produto final, variando muito entre clientes dos ramos alimentício e farmacêutico. Portanto, o uso da gelatina como ingrediente funcional é muito amplo e a utilização de lotes contaminados com esporos bacterianos resistentes, tanto na produção de cápsulas, comprimidos e alimentos em geral, causaria um grande impacto para indústria produtora, clientes e consumidores destes produtos, principalmente nos casos de intoxicações nos quais vidas humanas poderiam ser comprometidas.

5. Referências

- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>
- Aviat, F., Gerhards, C., Jerez, R.J., Michel, V., Bayon, I.L., Ismail, R. and Federighi, M., 2016. Microbial Safety of Wood in Contact with Food : A Review 15, 491–505. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12199>
- Berry, C., 2012. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.008>
- Blue, S. R., Singh, V.R., and Saubole, M.A., 1995. *Bacillus licheniformis* Bacteremia: Five Cases Associated with Indwelling Central Venous Catheters. *Clin. Infect. Dis.* 20, 629–633.
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretière, M.H., Auger, S., Sorokine, A., Nguyen-Thé, C., 2010. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.* 43, 1885–1894. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.024>
- Clerck, E. De, Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J., Vos, P. De, 2004. Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts Isolation , Characterization , and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts. *Am. Soc. Microbiol.* 70, 3664–3672. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3664>
- Courts, A.. W.A., 1977. The science and technology of gelatin. *J. Colloid Interface Sci.* 66, 373–374. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(78\)90323-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(78)90323-5)
- De Clerck, E., De Vos, P., 2002. Study of the bacterial load in a gelatine production process focussed on *Bacillus* and related endosporeforming genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 611–617. <https://doi.org/10.1078/07232020260517751>
- Devereux, R., Willis, S.G., 1995. Amplification of ribosomal RNA sequences, in: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 277–287. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0351-0_19
- Djagny, K.B., Wang, Z., Xu, S., 2001. Gelatin: A Valuable Protein for Food and

Pharmaceutical Industries: Review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 41, 481–492.

<https://doi.org/10.1080/20014091091904>

Downes, F.P. et al. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, p. 201–207.

Feitosa, T., 1999. Contaminação, Conservação e alteração da carne. EMBRAPA. Available in: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/421977/1/Dc034.pdf>

Gill, C., Jones, T., Bryant, J., Brereton, D., 2000. The microbiological conditions of the carcasses of six species after dressing at a small abattoir. Food Microbiol. 17, 233–239.

<https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0303>

Gill, C.O., Bryant, J., Landers, C., 2003. Identification of critical control points for control of microbiological contamination in processes leading to the production of ground beef at a packing plant. Food Microbiol. 20, 641–650. [https://doi.org/10.1016/S0740-](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00024-8)

[0020\(03\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00024-8)

Goldenberger, D., Perschil, I., Ritzler, M., Altwegg, M., 1995. A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. Genome Res. 4, 368–370. <https://doi.org/10.1101/gr.4.6.368>

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., De Vos, P., 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. J. Microbiol. Methods 26, 247–259.

[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00916-5](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00916-5)

Hoffmann, F.L., 2001. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. Bras. Aliment. 5, 4–9.

IEPEC. Notícias: O Brasil já é o maior exportador de carne bovina. Access in 18 ago. 2015. Online. Available in: <Notícias: O Brasil já é o maior exportador de carne bovina >.

Inan, K., Ozer, A., Ibrahim Guler, H., Osman Belduz, A., Canakci, S., 2016. Brevibacillus gelatini sp. nov., isolated from a hot spring. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 712–718.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000780>

Jericho, K.W.F., O’Laney, G., Kozub, G.C., 1998. Verification of the Hygienic Adequacy of Beef Carcass Cooling Processes by Microbiological Culture and the Temperature-Function Integration Technique. J. Food Prot. 61, 1347–1351.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.10.1347>

- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.-B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M., Rosselló-Móra, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Kakagianni, M., Aguirre, J.S., Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2017. Effect of storage temperature on the lag time of *Geobacillus stearothermophilus* individual spores. *Food Microbiol.* 67, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.009>
- Karim, A.A., Bhat, R., 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll.* 23, 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M., 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2, 189–198. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00269-0)
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., Shao, Z., 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2499–2508. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- Lycken, L., Borch, E., 2006. Characterization of *Clostridium* spp. Isolated from Spoiled Processed Cheese Products. *J. Food Prot.* 69, 1887–1891. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1887>
- Mcclure, P.J., 2015. *Bacillus cereus* in personal care products : risk to consumers 165–174. <https://doi.org/10.1111/ics.12191>
- Pirttijärvi, T.S.M., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2000. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00313-5)
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- Resolução - RDC nº 12, January of 2001. Access in 28 dec. 2018. Online. Available in: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm

- Rodriguez, C., Avesani, V., Van Broeck, J., Taminiau, B., Delmée, M., Daube, G., 2013. Presence of *Clostridium difficile* in pigs and cattle intestinal contents and carcass contamination at the slaughterhouse in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.017>
- Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z., He, G., 2016. International Journal of Food Microbiology The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009>
- Salkinoja-Salonen, 1999. Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4637–4645.
- Sagma - Associação dos fabricantes de gelatina da América do Sul. Access in 20 nov. 2018. Gelatina. Available in <http://www.sagma-gelatina.com/>.
- Schrieber, R., Gareis, H., 2007. *Gelatine Handbook, Nutrition*. Weinheim: Wiley-VCH GmbH, 345p. <https://doi.org/10.1002/9783527610969>
- Setlow, P., 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 76.
- Sharma, A., Dour, P., Gupta, P., 2006. Screening of Enterobacterial Contamination During Gelatin Production and its Effect on Pharmaceutical Grade Gelatin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1049–1054. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-4352-8>
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1999. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846–849. <https://doi.org/10.1128/EC.00022-15>
- Stevens, P.V. 1992. Trace bioorganic constituents of gelatins – A review *Food Australia* 44, 320–324.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D., 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Weishardt. Applications. Access in 23 jan. 2014. <http://www.weishardt.com/en/index.php?applications&whstl=gel&whmenu=smenu3>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

DISCUSSÃO & CONCLUSÃO

Devido a capacidade das bactérias formadoras de esporos resistirem a condições extremas, incluindo pressão, calor ou frio extremos, seca, inanição, biocidas, radiações UV, variações de pH e permanecerem inativas por séculos (Moeller et al., 2008; Nicholson and Law, 1999; Postollec et al., 2012) a contaminação de alimentos com bactérias esporuladas é consequentemente encontrada em quase todos os tipos de alimentos pois a resistência dos esporos favorece sua sobrevivência ao processamento de alimentos e a persistência nestes à longo prazo (Carlin, 2011).

Na cadeia produtiva da gelatina observou-se a presença dos grupos de aeróbios e anaeróbios mesófilos, aeróbios termófilos e do grupo *Bacillus cereus*, em todas as etapas desde a matéria-prima, sendo as etapas de extração, filtração, ultrafiltração, deionização e esteiras de secagem consideradas como pontos críticos pois apresentaram aumentos decimais nas contagens microbianas, sugerindo que há nestes pontos locais de multiplicação de micro-organismos com provável formação de biofilmes. Para eliminar as possibilidades de uma transferência de contaminação entre um processo e outro, as polpas de celulose utilizadas na ultrafiltração devem passar por um crítico processo de recuperação (Courts, 1977), além da troca das resinas utilizadas na etapa de deionização e a higienização das esteiras de secagem com sanitizantes adequados. No produto final também foi possível encontrar micro-organismos esporulados, porém em concentrações menores que durante o processo. Através do sequenciamento do gene 16S RNAr verificou-se a presença de isolados do grupo de *Bacillus cereus* e de *Bacillus licheniformis* ambos associados a produção de toxinas e produção de gelatinases (Salkinoja-Salonen et al., 1999; Kotiranta et al., 2000) podendo causar danos a saúde de consumidores e perdas econômicas à empresa.

No Brasil não existe uma legislação específica para o controle destes micro-organismos esporulados em gelatina, sendo as exigências para o produto final diferentes para a indústria farmacêutica e alimentícia. Na RDC 12 de 2 de janeiro de 2001, discorre sobre ausência de Coliformes à 45°C em misturas para preparo de sobremesas à base de gelatina e similares. Com a variada aplicabilidade da gelatina nas indústrias alimentícias e farmacêuticas torna-se essencial o desenvolvimento de trabalhos voltados para a melhoria do controle microbiológico durante o processo de produção. Para manter as propriedades físico-químicas do produto, o tempo e a temperatura do processo de redução bacteriana não podem ser alterados, assim outros pontos para controle microbiológico precisam ser constantemente avaliados. A gelatina é um ingrediente utilizado tanto em produtos alimentícios quanto em

produtos farmacêuticos que visam o melhoramento e o estado de saúde das pessoas (Sagma,2018). Consciente disso, a indústria de gelatina deve investir anualmente altos valores para assegurar e melhorar a qualidade perante as exigências dos clientes e das expectativas elevadas dos consumidores. Desde a escolha da matéria prima, até a gelatina seca e moída, o controle de qualidade deve estar presente em todas as fases do processo de produção.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63867-0>
- Almeida, P.F., 2016. Aplicação de gelatina obtida de subproduto animal como substituto parcial de gordura em spread de chocolate. USP.
- Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Guerini, M.N., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., 2007. Transportation and Lairage Environment Effects on Prevalence, Numbers, and Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on Hides and Carcasses of Beef Cattle at Processing. *J. Food Prot.* 70, 280–286. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.280>
- Ash, C., Priest, F.G., Collins, M.D., 1994. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>
- Aviat, F., Gerhards, C., Jerez, R.J., Michel, V., Bayon, I.L., Ismail, R. and Federighi, M., 2016. Microbial Safety of Wood in Contact with Food : A Review 15, 491–505. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12199>
- Barkocy-Gallagher, G.A., Edwards, K.K., Nou, X., Bosilevac, J.M., Arthur, T.M., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., 2005. Methods for Recovering *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle Fecal, Hide, and Carcass Samples: Sensitivity and Improvements. *J. Food Prot.* 68, 2264–2268. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2264>
- Berry, C., 2012. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.008>
- Blue, S. R., Singh, V.R., and Saubole, M.A., 1995. *Bacillus licheniformis* Bacteremia: Five Cases Associated with Indwelling Central Venous Catheters. *Clin. Infect. Dis.* 20, 629–633.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Available in: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/1201rdc>. Acess in: 2018
- Byrne, C.M., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., 2000. The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle

- hides to carcasses during slaughter. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 142–145.
<https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00689.x>
- Calvo, 2002. Estratégia em curtume: um estudo de caso 1. Faculdades Integradas Antonio Eufrásio de Toledo de Presidente Prudente. Available in:
<http://intertemas.toledoprudente.edu.br/index.php/ETIC/article/viewFile/941/912>
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretière, M.H., Auger, S., Sorokine, A., Nguyen-Thé, C., 2010. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.* 43, 1885–1894. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.024>
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinojasalonon, M., Svensson, B., Nguyenthe, C., Ehlinhschulz, M., 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022>
- Cavalli, D.R., 2006. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos, I-3, v. 26, 352–359.
- Clerck, E. De, Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J., Vos, P. De, 2004. Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts Isolation , Characterization , and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts. *Am. Soc. Microbiol.* 70, 3664–3672. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3664>
- Courts, A.. W.A., 1977. The science and technology of gelatin. *J. Colloid Interface Sci.* 66, 373–374. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(78\)90323-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(78)90323-5)
- De Clerck, E., De Vos, P., 2002. Study of the bacterial load in a gelatine production process focussed on *Bacillus* and related endosporeforming genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 611–617. <https://doi.org/10.1078/07232020260517751>
- De Clerck, E., Devos, J., de Vos, P., 2004. Molecular Characterisation of Bacterial Contamination in Semi-Final Gelatine Extracts, Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 612–619. <https://doi.org/10.1078/0723202041748217>
- De Clerck, E., Van Mol, K., Jannes, G., Rossau, R., De Vos, P., 2004. Design of a 5'?? exonuclease-based real-time PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus licheniformis*, members of the “*B. cereus* group” and *B. fumarioli* in gelatine. *Lett. Appl.*

- Microbiol. 39, 109–115. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01550.x>
- Devereux, R., Willis, S.G., 1995. Amplification of ribosomal RNA sequences, in: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 277–287. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0351-0_19
- Djagny, K.B., Wang, Z., Xu, S., 2001. Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41, 481–492. <https://doi.org/10.1080/20014091091904>
- Downes, F.P. et al. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, p. 201-207.
- FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 1998. *Bacteriological Analytical manual*. 8th edition. Revision A, Chapter 14.
- Feitosa, T., 1999. Contaminação, Conservação e alteração da carne. EMBRAPA. Available in: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/421977/1/Dc034.pdf>
- Francis A. Drobniowski, 1993. *Bacillus cereus* and Related Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 324–338.
- Gem: Gelatine Manufactures for Europe. About gelatine. 2014. Available in: <http://www.gelatine.org/en/about-gelatine/properties.html>. acesso em 24 mar.2014
- Gill, C., Jones, T., Bryant, J., Brereton, D., 2000. The microbiological conditions of the carcasses of six species after dressing at a small abattoir. *Food Microbiol.* 17, 233–239. <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0303>
- Gill, C.O., Bryant, J., Landers, C., 2003. Identification of critical control points for control of microbiological contamination in processes leading to the production of ground beef at a packing plant. *Food Microbiol.* 20, 641–650. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00024-8)
- Goldenberger, D., Perschil, I., Ritzler, M., Altwegg, M., 1995. A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *Genome Res.* 4, 368–370. <https://doi.org/10.1101/gr.4.6.368>
- Granum, E., T.L., 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 223–228.
- Harris, P. and J.-B.F., n.d. *FOOD GELS Microstructural Principles of Food Processing and*

- Engineering Biotechnology Applications in Beverage Production. London.
- Harrison-Dunn, A. Gelatin is more than just a texturizer. 2015. Access in 10. Jan.2019.
Available in: <https://www.nutraingredients.com/content/view/print/1188821>
- Harwood, C.R., 1989. *Bacillus*, V.2. ed. United Kingdom. <https://doi.org/DOI 10.1007/978-1-4899-3502-1>
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., De Vos, P., 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Methods* 26, 247–259.
[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00916-5](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00916-5)
- Hoffmann, F.L., 2001. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. *Bras. Aliment.* 5, 4–9.
- Huemer, I.A., Klijn, N., Vogelsang, H.W.J., Langeveld, L.P.M., 1999. Thermal Death Kinetics of Spores of 6946, 851–855.
- IEPEC. Notícias: O Brasil já é o maior exportador de carne bovina. Access in 18 ago. 2015.
Online.Available in:<Notícias: O Brasil já é o maior exportador de carne bovina >
- Inan, K., Ozer, A., Ibrahim Guler, H., Osman Belduz, A., Canakci, S., 2016. *Brevibacillus gelatini* sp. nov., isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 712–718.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000780>
- Jardim, F.B.B., Silva, E.N. da, Okura, M.H., Ramos, M.A., 2006. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 26, 277–282. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200008>
- Jay, J. M. *Modern Food Microbiology*. 4th ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.
- Jericho, K.W.F., O’Laney, G., Kozub, G.C., 1998. Verification of the Hygienic Adequacy of Beef Carcass Cooling Processes by Microbiological Culture and the Temperature-Function Integration Technique. *J. Food Prot.* 61, 1347–1351.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.10.1347>
- Johnson, C. T., G. R. Lupson, and K. E. Lawrence. 1994. The bovine placentome in bacterial and mycotic abortions. *Vet. Rec.* 134:263–266.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.-B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M., Rosselló-Móra, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus*

- cereus group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 383–391.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Kakagianni, M., Aguirre, J.S., Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2017. Effect of storage temperature on the lag time of *Geobacillus stearothermophilus* individual spores. *Food Microbiol.* 67, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.009>
- Karim, A.A., Bhat, R., 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll.* 23, 563–576.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M., 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2, 189–198. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00269-0)
- Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 21–70
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., Shao, Z., 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2499–2508.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- Lund, B.M., 1990. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet* 336, 982–986. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92431-G](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92431-G)
- Lycken, L., Borch, E., 2006. Characterization of *Clostridium* spp. Isolated from Spoiled Processed Cheese Products. *J. Food Prot.* 69, 1887–1891. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1887>
- Massaguer, P. R. *Microbiologia dos Processos Alimentares*. São Paulo, Editora Varela 2005, p. 258.
- Mcclure, P.J., 2015. *Bacillus cereus* in personal care products : risk to consumers 165–174. <https://doi.org/10.1111/ics.12191>
- Norris, j. R., Berkeley, R. C. W., Logan, N. A., and O'Donnell, A. G., 1981, The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*, in: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification* (M. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. Schlegel, eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 1711-1742.
- Oesser, S., Seifert, J., 2003. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in

- bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* 393–399.
<https://doi.org/10.1007/s00441-003-0702-8>
- Olson, K.E., Sorrells, K.M., 2001. Thermophilic Flat Sour sporeformers. In: Apha– American Public Health Association. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4a ed. Cap. 25. Washington, DC.
- Pacheco, J.V.F., 2005. Curtumes. São Paulo: CETESB, Available in: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>.
- Pacheco-Sanchez, C., 2005. Ocorrência de *Bacillus cereus*, Avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT. UNICAMP
- Pirttijärvi, T.S.M., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2000. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00313-5)
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 151–156.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- Resolução - RDC nº 12, January of 2001. Access in 28 dec. 2018. Online. Available in: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., López de León, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5, R77. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- Reyes, A.F., 2008. Esporulados E Indicadores Em Requeijão Cremoso. UNICAMP. Available in: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255404>
- Rosenkvist, H., 1995. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 353–363.
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00147-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00147-X)
- Rodriguez, C., Avesani, V., Van Broeck, J., Taminiau, B., Delmée, M., Daube, G., 2013. Presence of *Clostridium difficile* in pigs and cattle intestinal contents and carcass contamination at the slaughterhouse in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 256–262.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.017>

- Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z., He, G., 2016. International Journal of Food Microbiology The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. Int. J. Food Microbiol. 238, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009>
- Sagma - Associação dos fabricantes de gelatina da América do Sul. Access in 20 nov. 2018. Gelatina. Available in <http://www.sagma-gelatina.com/>.
- Salkinoja-Salonen, 1999. Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4637–4645.
- Schrieber, R., Gareis, H., 2007. Gelatine Handbook, Nutrition. Weihen: Wiley-VCH GmbH, 345p. <https://doi.org/10.1002/9783527610969>
- Setlow, P., 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 76.
- Sharma, A., Dour, P., Gupta, P., 2006. Screening of Enterobacterial Contamination During Gelatin Production and its Effect on Pharmaceutical Grade Gelatin. World J. Microbiol. Biotechnol. 22, 1049–1054. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-4352-8>
- Sousa, C.P. 2006. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme com o uso dos indicadores de qualidade de alimentos. Rev. APS 9, 83–88.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. 1999. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology E. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 846–849. <https://doi.org/10.1128/EC.00022-15>
- Stadhouders, J. 1992. Taxonomy of *Bacillus cereus*. Bull. International Dairy Federation, n. 275, p. 4 – 8.
- Stevens, P.V. 1992 Trace bioorganic constituents of gelatins – A review Food Australia 44, 320–324.
- Tode, S. “The GELITA Story”. 2003. Hamburg. Verlag Hanseatischer Merkur.
- Turnbull, P. C. B., and J. M. Kramer. 1995. *Bacillus*, p. 349–356. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D., 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence

Analysis. J. Eukaryot. Microbiol. 46, 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

Weishardt. Applications. Access in 23 jan. 2014.

<http://www.weishardt.com/en/index.php?applications&whstl=gel&whmenu=smenu3>

Zeigler, D.R., 2001. The Genus *Geobacillus*: Introduction & Strain Catalog. *Bacillus Genet. Stock Cent. Cat. Strains*, Vol. 3 27.

Ziegler, F.L., 2006. Desenvolvimento de um Produto Dietético Funcional para Idosos Funcional para Idosos. UNICAMP.

Zhou, P., Regenstein, M., 2007. Comparison of Water Gel Desserts from Fish Skin and Pork Gelatins Using Instrumental Measurements. *food cheistry Toxicol.* 72, 196–201. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00320.x>