

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE *Clostridium botulinum* E DA PRODUÇÃO DE
TOXINA EM MORTADELA E PRESUNTO

Presunso.

Este exemplar corresponde a versão
final da tese defendida por Valé-
ria Christina Amstalden Junqueira
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 21.12.94


Valéria Christina Amstalden Junqueira

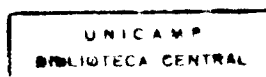
Orientador:

Prof. Dr. António de Melo Serrano

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, SP

- 1994 -



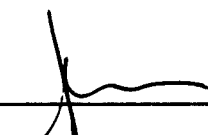
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano



Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão



Prof. Dr. Amaldo Yoshiteru Kuaye



Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício

Campinas, 21 de dezembro de 1994

DEDICO

**Ao Lourival
e as nossas filhas
Cecilia e Helena**

**A meus pais
e irmãos**

AGRADEÇO

- Ao Prof. Dr. António de Melo Serrano, pela orientação com carinho e amizade;
- À Dirce Yorika Kabuki e Maria Raquel Mannhani pela colaboração técnica e a Da. Jacinta Rodrigues de Oliveira Franco pelo auxílio na realização deste trabalho;
- À Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa, pelas sugestões dadas a este trabalho e pela confiança e estímulo na carreira de pesquisador científico;
- À Da. Maria Vicente de Carvalho, pelo carinho e cuidado dedicados às minhas filhas;
- À FEA - UNICAMP e ao ITAL pelo suporte financeiro desta tese;
- À Prefeitura Municipal de Campinas, na pessoa do Dr. Hidalgo Saloni, Coordenador do Serviço de Fiscalização da Alimentação Pública, pela coleta de amostras no varejo;
- Às indústrias SADIA e KRAKI, pela doação de materiais específicos;
- Aos pesquisadores e funcionários do CTC-ITAL, pelo auxílio na preparação dos produtos cárneos;
- A todos os professores, amigos e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA-UNICAMP;
- A todas as pessoas que direta, ou indiretamente, cooperaram para a realização desta tese;
- A Deus, por tudo que tenho recebido.

SUMÁRIO

	página
Resumo	III
Summary	IV
1. Introdução	01
2. Revisão bibliográfica	02
2.1. Cronologia das principais descobertas sobre o <i>Clostridium botulinum</i>	02
2.2. Caracterização do <i>Clostridium botulinum</i>	05
2.3. Manifestações clínicas do botulismo	11
2.4. Diagnóstico e isolamento de <i>Clostridium botulinum</i>	12
2.5. Habitat e epidemiologia de <i>Clostridium botulinum</i>	14
2.6. Incidência de <i>Clostridium botulinum</i> em carnes e derivados	20
2.7. Principais fatores no controle do desenvolvimento de <i>Clostridium botulinum</i> em alimentos	23
3. Materiais e Métodos	28
3.1. Materiais	28
3.1.1. Produtos alimentícios	28
3.1.2. Microrganismos	28
3.1.3. Meios de cultura	28
3.1.4. Equipamentos	29
3.1.5. Outros	30
3.2. Métodos	30
3.2.1. Pesquisa I: Incidência de <i>Clostridium botulinum</i> em mortadela e presunto	30

	página
3.2.1.1. Amostragem	30
3.2.1.2. Incidência de esporos de <i>Clostridium botulinum</i>	30
3.2.1.3. Incidência de esporos e de células vegetativas	33
3.2.1.4. Análises físico-químicas	33
3.2.2. Pesquisa II: Avaliação da possibilidade de produção de toxina em mortadela e presunto	33
3.2.2.1. Preparação das suspensões de esporos e contagem	33
3.2.2.2. Preparação de presunto cozido e de mortadela contaminados artificialmente com esporos de <i>Clostridium botulinum</i>	33
3.2.2.3. Análises físico-químicas dos produtos preparados, não-contaminados artificialmente	35
3.2.2.4. Produção e detecção de toxina botulínica	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1. Pesquisa I: Incidência de <i>Clostridium botulinum</i> em mortadela e presunto	36
4.2. Pesquisa II: Avaliação da possibilidade de desenvolvimento de toxina de <i>Clostridium botulinum</i> em mortadela e presunto, contaminados artificialmente com esporos	44
5. Conclusões	48
6. Referências bibliográficas	49

RESUMO

Na presente pesquisa foi realizada uma avaliação do risco de transmissão de botulismo por mortadela e presunto.

Numa primeira fase, foram examinadas amostras de mortadela e presunto cozido, coletadas ao acaso no varejo do município de Campinas - SP. A partir de 25 amostras de cada produto, em quadruplicata de 75g, num total de 100 subamostras, foi calculado o Número Mais Provável (NMP) de *C. botulinum* por kg de mortadela e presunto. Nesta fase, ainda foram determinados o tempo e a temperatura de estocagem na revenda, bem como o pH, atividade de água, concentração de cloreto de sódio e de nitrito de sódio e umidade desses produtos.

Na segunda fase, mortadela e presunto elaborados por nós e artificialmente contaminados com 10^4 esporos de *C. botulinum* tipos A e B por amostra foram avaliados quanto à possibilidade de toxigênese do microrganismo, quando submetidos à estocagem inadequada, à temperatura de 30°C.

Os resultados obtidos permitiram estimar a incidência de *Clostridium botulinum* na ordem de 0,27NMP/kg de mortadela e inferior a 0,13NMP/kg de presunto.

A formação de toxina botulínica foi observada nas amostras de presunto artificialmente contaminadas, após 12 dias de estocagem à temperatura de 30°C. Ao fim de 28 dias de estocagem, à mesma temperatura, não foi detectada toxina nas amostras de mortadela.

EVALUATION OF THE INCIDENCE OF *Clostridium botulinum* AND TOXIN PRODUCTION IN MORTADELLA AND HAM.

SUMMARY

The risk of transmitting botulism via mortadella and ham was evaluated in this research.

In the first phase, samples of mortadella and cooked ham were acquired at random from shops in the region of Campinas - SP. Twenty five samples of each product were acquired and examined in quadruplicate (75g each) giving a total of 100 sub-samples. The Most Probable Number (MPN) for *C. botulinum* per kg of mortadella or ham, was calculated. The storage times and temperatures at the distributors were also determined plus the pH, water activity, sodium chloride and sodium nitrite concentrations and water content.

In the second phase, mortadella and ham were produced in the pilot plant and contaminated with 10^4 *C. botulinum* types A and B spores per sample. These samples were evaluated to determine the possibility of toxin formation by the microorganism when the products were submitted to inadequate storage at a temperature of 30°C.

The results obtained allowed for the estimation of an incidence of *C. botulinum* at a level of 0,27 MPN/kg in mortadella and below 0,13 MPN/kg in ham.

The formation of botulinum toxin was observed after 12 days of storage at 30°C in the artificially contaminated ham samples. After 28 days of storage at the same temperature, no toxin was detected in the samples of mortadella.

1. INTRODUÇÃO

O botulismo alimentar é uma intoxicação decorrente do consumo de alimentos contaminados por toxina produzida pela bactéria anaeróbia esporogênica denominada *Clostridium botulinum*.

Com base nas numerosas pesquisas realizadas sobre a ocorrência de *C. botulinum* na natureza, sabe-se que seu habitat natural é o solo e os sedimentos aquáticos. A partir deste habitat, ele pode contaminar os mais diferentes tipos de alimentos, tanto de origem vegetal, como também os de origem animal. Geralmente, os alimentos envolvidos em surtos de botulismo são as conservas caseiras de vegetais e pescado, bem como os embutidos de carne e presunto.

O desenvolvimento do *C. botulinum* em alimentos é condicionado por vários fatores de natureza física e/ou química aos quais chamamos de barreiras. O controle da atividade de água - A_w (limitando o teor de água disponível no alimento), a acidez, a utilização de temperaturas elevadas de processamento, a estocagem em baixa temperatura, o uso de cloreto de sódio e de nitritos ou outros conservadores são algumas das barreiras mais comumente utilizadas. Um nível elevado de contaminação por esporos de *C. botulinum* pode aumentar severamente a possibilidade do desenvolvimento e produção de toxina por esta bactéria.

A presente pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar a frequência e a intensidade da contaminação por *C. botulinum* em mortadela e presunto, bem como verificar as quantidades dessas barreiras existentes nos produtos expostos na revenda.

Dentre os produtos industrializados derivados de carne, escolhemos a mortadela e o presunto por serem geralmente ingeridos sem aquecimento prévio. O tempo necessário para haver toxigênese de *C. botulinum* nesses produtos, quando estocados em temperatura inadequada, também foi avaliado em produtos por nós elaborados e artificialmente contaminados. Isso nos permitiu esclarecer até que ponto há segurança no consumo de tais produtos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CRONOLOGIA DAS PRINCIPAIS DESCOBERTAS SOBRE O *Clostridium botulinum*

O botulismo de origem alimentar provavelmente tem ocorrido desde que o homem vem tentando conservar alimentos para consumo posterior. Durante o século XVIII, na Europa Central, essa doença era geralmente associada ao consumo de embutidos, principalmente de sangue ou fígado. Por essa associação ao produto foi introduzido o termo botulismo, do latim "botulus", que significa embutido, para denominar a doença (DOLMAN, 1964; SMITH, 1977).

Em 1896, van ERMINGEN citado por DOLMAN (1964), estudando um surto de envenenamento alimentar ocorrido em Ellezelles, Bélgica, associado ao consumo de presunto cru salgado, que ocasionou uma doença semelhante ao envenenamento por embutidos, isolou o microrganismo causador, ao qual chamou *Bacillus botulinus* (esta designação permaneceu até 1923, quando foi redenominado *Clostridium botulinum*). Em seu estudo, van ERMINGEN observou que este microrganismo era uma bactéria em forma de bastonete, produtora de esporos que descreveu como sendo rapidamente destruídos por aquecimento a 80°C. A temperatura ótima de crescimento desta bactéria era de 20 a 30°C em meio de carne de porco cozida, adicionado de 1% de glicose, peptona e cloreto de sódio e 2% de gelatina. As culturas eram fracamente gelatinolíticas e cresciam em meio contendo até, aproximadamente, 5% de cloreto de sódio, porém eram inibidas sob concentrações salinas mais elevadas. Van ERMINGEN demonstrou ainda que esta bactéria produzia uma toxina sensível à luz, ar, álcalis e especialmente ao calor, sendo destruída completamente por ebulição durante 5 minutos. Por outro lado, a toxina era resistente à acidificação, precipitação por álcool e sulfato de amônia, à diálise e à proteólise. Alguns animais de laboratório, tais como coelhos, cobaias, camundongos e macacos eram altamente susceptíveis à toxina administrada por via oral; em contraste, outros animais como gatos, ratos, cães, pombos e frangos eram resistentes. Com base nas descrições muito bem detalhadas de van ERMINGEN, este isolamento, perdido ao longo do tempo pôde, mais tarde, no século XX, ser reconhecido como sendo de uma cepa não-proteolítica de *C. botulinum* tipo B (DOLMAN, 1964, SMITH, 1977, LYNT *et al.*, 1982, SPERBER, 1982).

Em 1904, LANDMANN citado por DOLMAN (1964) isolou *C. botulinum* de feijões enlatados, causadores de um surto ocorrido em Darmstadt, na Alemanha, envolvendo 12 pessoas, das quais 11 morreram. Esta foi a primeira vez que um alimento de origem vegetal foi implicado em surto de botulismo.

Em 1910, LEUCHS citado por DOLMAN (1964) relatou que as cepas isoladas por van ERMENGEN e LANDMANN em 1896 e 1904, respectivamente, produziam, cada uma delas, neurotoxinas sorologicamente diferentes e que havia, portanto, mais de um tipo do microrganismo. Em 1919, BURKE citado por SMITH (1977) confirmou a diferença sorológica das duas toxinas botulínicas e designou os dois tipos de B e A, respectivamente.

Em 1922, o tipo C de *C. botulinum* foi isolado por BENGSTON citado por SMITH (1977), nos Estados Unidos e por SEDDON citado por SMITH (1977), na Austrália, a partir de botulismo em frangos e bovinos, respectivamente. Em 1924, PFENNINGER citado por SMITH (1977) observou algumas diferenças sorológicas entre estas duas cepas do tipo C isoladas: a antitoxina produzida pela cepa americana, isolada por BENGSTON, neutralizava a toxina homóloga, bem como a toxina produzida pela cepa australiana, porém a antitoxina produzida a partir da cepa isolada por SEDDON neutralizava apenas a toxina homóloga. Assim, em 1929, GUNNISON, MEYER citado por SMITH (1977) classificaram as cepas do tipo C em subtipos C alfa e C beta.

Em 1927, DuTOIT, ROBINSON citado por SMITH (1977) isolaram o tipo D de *C. botulinum* a partir de bovinos doentes, na África do Sul.

Entre 1936-1937, o tipo E foi encontrado em dois lugares diferentes. BIER citado por SMITH (1977), na Ucrânia, isolou uma cepa proveniente de pescado envolvido em um surto de botulismo e, quase ao mesmo tempo, HAZEN citado por SMITH (1977) isolou outra cepa a partir de pescado enlatado, processado na Alemanha, que havia causado botulismo em três pessoas e a morte de uma delas.

Em 1943, nos Estados Unidos da América, foi reconhecido o primeiro caso de botulismo de feridas. Esta categoria de botulismo é consequência da formação

de toxina em uma lesão infeccionada, após a multiplicação do *C. botulinum* (CENTER FOR DISEASE CONTROL - CDC, 1979).

Em 1960, na Dinamarca, MOLLER, SCHEIBEL (1960) reconheceram o tipo F de *C. botulinum*. Este tipo foi isolado de pasta de fígado preparada em casa, envolvida em um surto de botulismo com quatro casos e uma morte.

Em 1970, o último tipo de *C. botulinum* reconhecido e designado como tipo G foi isolado de uma amostra de solo por GIMENEZ, CICCARELLI (1970), na Argentina.

Em 1976, foi reconhecido o botulismo infantil, doença resultante da absorção da toxina botulínica "in vivo" no trato intestinal de crianças, geralmente com idade inferior a um ano, após a ingestão de esporos e multiplicação do *C. botulinum* no intestino infantil (CDC, 1979).

Em 1978, os mesmos descobridores do tipo G de *C. botulinum* demonstraram, pela primeira vez, a produção de mais de um tipo de toxina por uma mesma cepa de *C. botulinum*. Esta nova cepa, produtora das toxinas A e F, foi designada subtipo AF. Este subtipo foi isolado repetidamente na Argentina (HAUSCHILD, 1989). Em 1981, HATHEWAY, Mc CROSKEY (1981) relataram o isolamento de uma cepa produtora de toxinas B e F e, a seguir, POUMEYROL *et al.* (1983) isolaram uma cepa produtora de toxinas A e B.

No biênio 1985-1986, a toxina botulínica foi reconhecida como sendo produzida por outras espécies do gênero *Clostridium*. HALL *et al.* (1985) relataram a produção de toxina botulínica tipo F por uma cepa de *C. barati* e McCROSKEY *et al.* (1986) demonstraram a produção de toxina tipo E por cepas de *C. butyricum*.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DO *Clostridium botulinum*

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria anaeróbia esporogênica, Gram positiva, em forma de bastonete reto ou ligeiramente curvado. Os esporos são ovais, o esporângio é dilatado e geralmente subterminal. A bactéria é móvel por flagelos peritricos, sendo observada ao microscópio usualmente isolada e menos freqüentemente aos pares ou em cadeias curtas (SNEATH *et al.*, 1986)

A espécie inclui sete tipos, A, B, C, D, E, F e G, diferenciados pela especificidade antigênica de suas toxinas. As toxinas produzidas pelos vários tipos de *C. botulinum* são proteínas termolábeis, sorologicamente distintas, porém com efeitos sintomáticos similares (SNEATH *et al.*, 1986).

Os tipos A, B e E de *C. botulinum* têm causado a maioria dos casos de botulismo em humanos, enquanto os tipos C e D são mais freqüentemente envolvidos em botulismo de outros mamíferos e aves (SMITH, 1977, EKLUND, 1982). O tipo F, definitivamente foi implicado em apenas dois surtos de botulismo no homem e o tipo G ainda não foi reconhecido em casos de botulismo (HAUSCHILD, 1989). Contudo, o microrganismo e a toxina tipo G foram identificados em material de autópsia, a partir de cinco casos de morte súbita de pacientes acometidos por outras doenças (SONNABEND *et al.*, 1981).

As toxinas botulínicas são designadas de forma correspondente aos tipos das cepas de *C. botulinum* que as produzem. Uma vez que a maioria das cepas produz apenas um tipo de toxina esta forma de classificação tem-se mostrado prática. Porém, esta simplicidade não existe: o tipo C de *C. botulinum* é dividido em subtipos C α e C β , desde 1924. As cepas C α produzem três tipos de toxina, C1, C2 e D, e as cepas C β produzem somente toxinas C2. Quanto às cepas do tipo D elas produzem toxinas D, C1 e C2 (SMITH, 1977). Assim, SUGIYAMA (1980) reconhece oito tipos de toxinas A, B, C1, C2, D, E, F e G, considerando que as toxinas C1 e C2 são completamente diferentes quanto à especificidade sorológica. Os autores que ainda se referem a sete tipos de toxina consideram C1 e C2 como subtipos de toxina.

HAUSCHILD (1989), fazendo uma revisão, correlaciona os tipos e subtipos mencionados de *C. botulinum* da forma exposta no Quadro 1 e as toxinas em maiores e menores, de acordo com as quantidades produzidas, respectivamente.

QUADRO 1. Toxinas de *C. botulinum*.

Tipos	Subtipos	Toxinas	
		Maiores	Menores
A	-	A	-
	AB	A	B
	AF	A	F
B	-	B	-
	BA	B	A
	BF	B	F
C	(C α)	C ₁	C ₂ , D
	(C β)	-	C ₂
D	-	D	C ₁ , C ₂
E	-	E	-
F	-	F	-
G	-	G	-

Fonte: HAUSCHILD (1989).

O agrupamento dos tipos de *C. botulinum*, com base nas semelhanças metabólicas, foi introduzido por HOLDEMAN, BROOKS (1970), para os tipos de A a F até então reconhecidos. Estes grupos permaneceram dispostos da forma que se segue:

Grupo I - inclui todas as cepas do tipo A e as cepas proteolíticas dos tipos B e F; fermentam alguns carboidratos (Quadro 2).

Grupo II - inclui todas as cepas do tipo E e as cepas não-proteolíticas dos tipos B e F; são fortemente sacarolíticos, fermentando açúcares com grande produção de gases.

Grupo III - inclui todas as cepas dos tipos C e D, as quais podem ser fracamente ou não-proteolíticas.

SMITH, HOBBS (1974) incluíram o tipo G em um quarto grupo separado:

Grupo IV - que inclui todas as cepas do tipo G, proteolíticas mas que não fermentam carboidratos.

O termo proteolítico refere-se à digestão da caseína, das proteínas da carne, do ovo coagulado e do soro sangüíneo, mas não à hidrólise de gelatina ou de outras proteínas modificadas, que as cepas não-proteolíticas também conseguem hidrolisar (SNEATH *et al.*, 1986).

Algumas toxinas botulínicas, em particular, aquelas produzidas pelas cepas não-proteolíticas, requerem ativação com proteases, tais como a tripsina (para efetividade nos testes de laboratório), o que ocorre naturalmente durante a passagem do alimento contaminado pelo estômago da vítima (CDC, 1979).

No Quadro 2 expressamos algumas características bioquímicas dos quatro grupos de *C. botulinum*, de acordo com HOLDEMAN *et al.* (1977).

QUADRO 2. Algumas características bioquímicas de *Clostridium botulinum*.

Características	Grupos			
	I	II	III	IV
Digestão de Proteínas	+	-	-*	+
Hidrólise de gelatina	+	+	+	+
Fermentação de:				
- glicose	+	+	+	-
- manose	-	+	+	-
- frutose	-*	+	v	-
- sacarose	-	+	-	-
- lactose	-	-	-	-
Produção de:				
- urease	-	-	-	-
- lipase	+	+	+	-
- lecitinase	-	-	-*	-
- indol	-	-	-*	-
Redução de nitrato	-	-	-	-

Símbolos: + = reação positiva; - = reação negativa; v = reação variável; * = reação positiva fraca em algumas cepas.

A determinação por cromatografia dos produtos da fermentação em caldo peptona-extrato de levedura-glicose ("PYG") permite confirmar a divisão estabelecida nos quatro grupos metabólicos de *C. botulinum* (HOLDEMAN *et al.*, 1977, SNEATH *et al.*, 1986). São detectados, de modo geral, no Grupo I, grandes quantidades dos ácidos acético e butírico, quantidades moderadas dos ácidos isobutírico, isovalérico e propiônico e traços dos ácidos isocapróico e valérico; no Grupo II, apenas os ácidos acético e butírico; no Grupo III, adicionalmente aos ácidos acético e butírico, aparece, em grande quantidade o ácido propiônico; no Grupo IV, o ácido acético é detectado em grande quantidade e os ácidos butírico, isobutírico e isovalérico em quantidades moderadas.

O conteúdo de guanina e citosina (G + C) no ácido desoxiribonucléico (ADN), de acordo com SNEATH *et al.* (1986) também possui homologia entre os tipos de *C. botulinum* dispostos naqueles grupos descritos. Nos grupos I e III, o conteúdo de G + C é de 26-28 mol%; no grupo II é de 27-29 mol% (SNEATH *et al.*, 1986); e no grupo IV de 28-30 mol% (SUEN *et al.*, 1988).

Quanto à temperatura de crescimento, no Quadro 3 expressamos as faixas de temperaturas ótimas e os extremos onde ocorre crescimento. À temperatura máxima de 50°C, há crescimento de tipos proteolíticos A, B e F e à mínima de 3,3°C há tipos não-proteolíticos E, B e F que conseguem crescer.

QUADRO 3. Temperaturas de crescimento de *Clostridium botulinum*

Tipos	Temperatura (°C)		Referência
	ótima	extremos	
A, B e F proteolíticos	28-40	10-48	BONVENTRE, KEMPE (1959); SPERBER (1982)
	----	50	GENIGEORGIS (1981)
E, B e F não-proteolíticos	25-37	3,3-45	SPERBER (1982); SNEATH <i>et al.</i> (1986)
C, D e G	30-37	----	SNEATH <i>et al.</i> (1986)

Apesar de tantas diferenças existentes entre os quatro grupos descritos, tem-se conservado o *C. botulinum* em uma só espécie devido à ação similar que as toxinas produzidas pelos diversos tipos provocam nos animais. Contudo, em 1988, a criação de uma nova espécie para o gênero *Clostridium* foi proposta por SUEN *et al.* (1988), denominando *Clostridium argentinense* sp. nov. todas as cepas de *C. botulinum* produtoras de toxina tipo G incluídas no grupo IV. Com o descobrimento de cepas de *Clostridium barati* e de *C. butyricum* produtoras de toxinas botulínicas toda a classificação deve ser revista.

2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO BOTULISMO

A toxina botulínica atua sobre o sistema nervoso periférico ao bloquear a passagem do estímulo nos terminais dos nervos, causando principalmente distúrbios neuromusculares e digestivos. Os sintomas mais freqüentes desta intoxicação são: diplopia, fotofobia, disfagia, cansaço generalizado, disfonia e vertigens. Náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, às vezes precedem o início dos sintomas neurológicos, porém, a constipação é comum à medida que o envolvimento neurológico progride. Como principais sinais de botulismo observam-se dificuldade respiratória, fraqueza muscular ou paralisia, ataxia, pupilas fixas e dilatadas e ptose das pálpebras. As membranas mucosas da boca, língua e faringe apresentam-se freqüentemente secas. O sistema nervoso central não é afetado e o processo mental permanece normal. A ausência de febre é característica, a menos que complicações, devido a algum tipo de infecção, venham a se desenvolver. A pulsação do paciente geralmente é normal ou mais lenta, mas pode ocorrer taquicardia devido ao desenvolvimento de hipotensão. À medida que a doença progride, ocorre maior dificuldade respiratória, sendo que a principal causa de morte por botulismo é decorrente da parada respiratória (CDC, 1979, SAKAGUCHI, 1979, SUGIYAMA, 1980).

O aparecimento dos sintomas e sinais de botulismo pode ocorrer em poucas horas ou tão tarde quanto oito dias após a ingestão do alimento contaminado com a toxina. O período normal de incubação é de 18 a 36 horas. Geralmente, os pacientes apresentando período de incubação da doença mais curto são afetados mais severamente e mais comumente são os que morrem e, os que sobrevivem, desenvolvem uma recuperação mais prolongada (CDC, 1979).

De acordo com BOROFF, DASGUPTA (1971), a toxina botulínica é o produto natural com maior poder letal que se conhece. LAMMANA (1959) menciona que menos de $0,1 \times 10^{-3}$ micrograma causa a morte de um camundongo. Para humanos, a dose letal não é conhecida, estimando-se que não mais que 1 micrograma de toxina pode ser fatal.

2.4. DIAGNÓSTICO E ISOLAMENTO DE *Clostridium botulinum*

O diagnóstico do botulismo de origem alimentar é geralmente confirmado quando, em adição aos sintomas clínicos característicos deste tipo de intoxicação, a toxina botulínica e/ou o *C. botulinum* viável são detectados em amostras do alimento suspeito ou em amostras clínicas do paciente ou em ambos (CDC, 1979). As amostras clínicas podem constituir-se de soro sanguíneo, fezes, vômito, conteúdo gástrico, líquido de enemas e porções de intestino delgado, grosso e fígado, em casos de morte do paciente e autópsia. Com exceção do soro, as demais amostras também podem ser utilizadas para detecção da bactéria.

Em casos de botulismo infantil, HATHEWAY, Mc CROSKY (1981) relataram que as fezes são as amostras que mais comumente contêm *C. botulinum* viável e/ou sua toxina. Amostras de soro raramente têm se apresentado positivas para toxina, nestes casos.

A detecção de toxina botulínica é, geralmente, feita por meio do ensaio biológico em camundongos. Este teste baseia-se na ação letal da toxina em camundongos e na sua neutralização com antitoxina específica e permite detectar menos que 0,1 micrograma de toxina (SAKAGUCHI, 1979). O procedimento básico inclui a injeção intraperitoneal de camundongos fêmeas, tipo "Swiss", pesando de 20-30g, com amostras líquidas ou extratos de amostras sólidas, com e sem antitoxina específica (CDC, 1979). Os extratos são preparados macerando-se a amostra com solução tampão ligeiramente ácida, tal como fosfato-gelatina pH 6,6, (BOWMER, 1963). O extrato é então separado por centrifugação a 12.000g, durante 20 minutos, sob refrigeração (4°C) e, quando necessário, filtrado em membrana de 0,45µm, para evitar infecções no camundongo. Em adição à filtração, as infecções no camundongo também podem ser controladas com 200mg/kg de tetraciclina no extrato a ser injetado (HEALTH PROTECTION BRANCH - HPB, 1973). Tratamentos com tripsina também podem ser necessários para ativar a toxina, especialmente, quando cepas não-proteolíticas estão envolvidas. A tripsina não interfere na neutralização com antitoxina (CDC, 1979, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 1984).

A escolha das antitoxinas utilizadas na neutralização da toxina depende dos tipos mais possivelmente suspeitos de estarem envolvidos. Em casos de botulismo humano de origem alimentar, a neutralização preliminar com antitoxina trivalente (A, B, E) e com duas destas antitoxinas monovalentes é usualmente adequada. A neutralização pode ser feita "in vitro" ou injetando-se previamente os camundongos antes de injetar o extrato com as antitoxinas escolhidas. Este último método é mais trabalhoso e raramente utilizado (HAUSCHILD, 1989).

Como as toxinas são termolábeis, uma porção do alimento ou das amostras clínicas (com exceção do soro sanguíneo) deve ser aquecida a 100°C durante 10 minutos e injetada em um par de camundongos para servir de controle negativo (CDC, 1979).

Os sinais típicos de botulismo no camundongo são: pêlo eriçado, estreitamento da cintura, respiração ofegante, dificuldade de locomoção, principalmente com os membros posteriores, paralisia progressiva e morte (KAUTTER, LYNT, 1984). Tempos de sobrevivência são menores com quantidades maiores de toxina, porém se ocorrerem mortes com menos de duas horas da injeção, a causa mais comum é a presença de agentes não-específicos. A maioria das mortes por botulismo geralmente ocorre ao redor de 24 horas, porém, a observação dos camundongos deve continuar por até quatro dias. Quando apenas um camundongo do par inoculado morrer (1/2) após 24 horas, recomenda-se a inoculação de mais um par. Neste caso, o resultado é considerado positivo para toxina quando dois ou mais camundongos morrerem (pelo menos 2/4). Algumas amostras, provavelmente contendo pequenos níveis de toxina, podem causar sinais de botulismo, sem contudo causar a morte do camundongo; nestes casos, resultados definitivos podem ser obtidos aumentando-se a dose injetada (por exemplo 0,4 - 0,5ml para 0,8 a 1,0ml, no máximo).

O ensaio biológico em camundongos tem permanecido sem modificações durante décadas. Vários outros testes "in vitro" também foram desenvolvidos, porém, até o presente, nenhum deles parece ser tão sensível e poucos são tão específicos e seguros. HOBBS et al. (1982) relataram que dentre os métodos "in vitro", os mais sensíveis permitem a detecção de aproximadamente 1 micrograma de toxina por mililitro. Os ensaios de detecção também dependem do tipo e das condições da toxina.

Na detecção de *C. botulinum* viável, o procedimento consiste essencialmente da inoculação das amostras clínicas ou de alimentos em caldo de enriquecimento e identificação da toxina neste caldo através do ensaio biológico. Os meios de enriquecimento comumente utilizados são meio de carne cozida ("CMM"), meio de carne cozida com glicose, meio de carne cozida-glicose-amido ("CMGS"), meio de triptona-peptona-glicose-extrato de levedura ("TPGY") sem ou com tripsina (FDA, 1984, ELLIOT *et al.* 1988). No mínimo, dois tubos do meio de enriquecimento devem ser inoculados. Um deles, após inoculação, deve ser aquecido a 75-80°C ou a 60°C durante 10 a 15 minutos, para cultura seletiva dos esporos; o outro tubo deve ser inoculado e incubado sem aquecimento prévio para permitir o desenvolvimento de esporos de tipos não-proteolíticos e de células vegetativas de *C. botulinum* (FDA, 1984).

Os meios sólidos para isolamento de *C. botulinum* a partir dos meios de enriquecimento podem conter sangue (DOLMAN, 1964) ou, mais comumente, emulsão de gema de ovo (CDC, 1979, FDA, 1984, KAUTTER, LYNT, 1984, ELLIOTT *et al.*, 1988). O *C. botulinum*, assim como alguns outros clostridia, produzem enzimas lipolíticas que causam a precipitação da gordura contida no meio, resultando em uma iridescência ou aparência aperolada ao redor e por cima das colônias (KAUTTER, LYNT, 1984). A inclusão de gema de ovos aos meios de cultura também permite a recuperação de esporos injuriados pelo calor, provavelmente devido à presença de lisosima (HAUSCHILD, HILSHEIMER, 1977).

As placas de Petri contendo meios sólidos inoculados devem ser incubadas em atmosfera anaeróbia imediatamente após a semeadura. O gás nitrogênio é recomendado em KAUTTER, LYNT (1984) para obtenção de atmosfera anaeróbia em jarras, podendo ser utilizado também o gás hidrogênio puro (FUTTER, RICHARDSON, 1971, SERRANO, JUNQUEIRA, 1991) ou em combinação com gás carbônico e nitrogênio.

2.5. HABITAT E EPIDEMIOLOGIA DE *Clostridium botulinum*

A distribuição geográfica dos esporos de *C. botulinum* na natureza tem sido extensivamente estudada por diversos pesquisadores. HAUSCHILD (1989) apresenta um

sumário geral sobre essa ocorrência, a nível mundial, mostrando que os ambientes terrestres e aquáticos são o "habitat" natural deste microrganismo. Em geral, o número de esporos, os tipos de *C. botulinum* no ambiente e a relativa prevalência do tipo de toxina produzida são fatores significativos associados com a incidência de surtos de botulismo. A esse respeito, SMITH (1977), BANWART (1979) e HAUSCHILD (1989) mencionam que os surtos de botulismo ocorridos nos Estados Unidos foram devidos principalmente às cepas do tipo A deste microrganismo, país onde esporos deste tipo preponderam no solo; já os ocorridos na Europa foram devidos às cepas do tipo B; na Escandinávia, Japão, Canadá, Alasca e parte da U.R.S.S., o tipo E foi mais frequentemente relacionado com os surtos (ver Quadro 4). SMITH (1977) sugere que a psicrotolerância das cepas do Grupo II deve ser o fator-chave para a prevalência do tipo E naquelas regiões de clima frio do hemisfério norte, bem como no ambiente aquático.

Tanto os alimentos de origem animal, quanto vegetal mostram-se envolvidos em surtos humanos de botulismo alimentar (Quadro 5). Os pescados (peixes, crustáceos, ovas de peixe e outros produtos) aparecem frequentemente associados ao tipo E. Os alimentos associados com o tipo A são principalmente vegetais, enquanto o tipo B é predominante em produtos cárneos (BANWART, 1979, HAUSCHILD, 1989).

Nos Quadros 4 e 5 também podemos evidenciar o diagnóstico de surtos de botulismo alimentar em diferentes partes do mundo. Na América do Sul, foram relatados pela Argentina 20 surtos em período de 10 anos (1970-1980), sendo identificado *C. botulinum* tipo A em 14 destes surtos (Quadro 4). Os alimentos predominantemente envolvidos em surtos relatados neste país desde 1922 até 1980 foram os de origem vegetal (Quadro 5).

No Brasil, revisões científicas elaboradas por LEITÃO (1982) e SERRANO (1990) mencionam dados sobre a ocorrência de *Clostridium botulinum* no ambiente marinho e terrestre e seu envolvimento em casos e surtos de botulismo em bovinos, galináceos e no homem. De acordo com o Ministério da Agricultura, nos anos de 1980 e 1982, ocorreram, respectivamente, 230 e 377 surtos de botulismo em bovinos, abrangendo rebanhos de diversos Estados brasileiros, com maior incidência nos Estados de Goiás e Minas Gerais (SERRANO, 1990), porém nem todos os surtos foram confirmados laboratorialmente.

Surtos de botulismo em galináceos foram relatados nos Estados do Rio Grande do Sul (SARAIVA, 1978) e São Paulo (SERRANO, 1990).

Em humanos, o primeiro surto de botulismo relatado ocorreu em 1958, no Rio Grande do Sul e envolveu 9 pessoas, das quais 7 morreram. O alimento incriminado foi conserva caseira de escabeche de corvina e *Clostridium botulinum* produtor de toxina tipo A foi isolado deste alimento (PEREIRA FILHO, 1958).

Em dezembro de 1981, no Rio de Janeiro, dois casos prováveis de botulismo, com uma morte, foram relatados por SERRANO (1982). O alimento suspeito foi patê de frango industrializado, porém, as investigações não ofereceram resultados conclusivos, embora, com base nas manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes, a possibilidade de se tratar de botulismo ficasse bastante provável.

Em 1986, um surto de botulismo alimentar envolvendo sete pessoas da mesma família e outro caso não relacionado com a família foram confirmados no Triângulo Mineiro (FERREIRA *et al.*, 1987). O alimento relacionado ao surto foi preparado com carne de porco e conservado imerso na própria banha, sendo posteriormente ingerido, com aquecimento apenas para derreter a gordura superficial; das sete pessoas envolvidas, duas morreram com severa dificuldade respiratória e as demais receberam tratamento com soro anti-botulínico tipos A e B e se recuperaram. Através de ensaio biológico em camundongos, toxina botulínica tipo A foi detectada no sangue dos pacientes, porém, o alimento incriminado não foi examinado. Onze meses mais tarde, um jovem de 16 anos apresentou sinais e sintomas de intoxicação relacionados ao botulismo. Toxina botulínica tipo A foi detectada em seu soro sanguíneo e após receber anti-soro tipos A e B, o paciente se recuperou. Relação entre a intoxicação e algum alimento não foi estabelecida neste caso.

Em março de 1990, no Município de São Paulo, foi relatado um caso de botulismo em indivíduo do sexo masculino (ARAP *et al.*, 1993). Este caso foi confirmado laboratorialmente: o exame do soro sanguíneo do paciente apresentou toxina botulínica tipo A e/ou B; a partir de cultura de fezes foi isolado *Clostridium botulinum* tipo A; dentre os alimentos suspeitos, uma amostra de conserva vegetal caseira ("pickles") revelou a presença de toxina botulínica e do microrganismo. A conserva foi preparada a partir de

vegetais crus (cenoura, couve-flor, pimentão, cebola, nabo, couve-de-bruxelas e fundos de alcachofra), previamente aferventados rapidamente em água e sal e adicionados de ovos de codorna e pepino "cornichon" em conserva. Estes produtos foram distribuídos em frascos de vidro previamente limpos e aferventados e imersos em calda constituída de nove partes de azeite para uma parte de vinagre. Os frascos foram hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente. O frasco de conserva envolvido na intoxicação do homem foi sendo consumido durante cerca de três meses. O mesmo frasco foi levado ao litoral de São Paulo durante uma viagem, no mês de janeiro, e certamente consumido por mais uma pessoa idosa do sexo feminino, que desenvolveu mal súbito com sintomas neurológicos, evoluindo rapidamente para o óbito, sem que tivesse sido aventada, na época, a hipótese de botulismo (ARAP, *et al.*, 1993).

Quando comparamos os dados existentes no Brasil com aqueles de outras partes do mundo, devemos considerar que os poucos casos conhecidos em nosso país não representam a extensão do problema e que existe uma intensa necessidade de se ampliar a prevenção da doença, principalmente nas áreas de saúde pública, medicina veterinária e tecnologia de alimentos (LEITÃO, 1982, SERRANO, 1990).

QUADRO 4. Tipos de *C. botulinum* envolvidos em surtos de botulismo.

Local	Período	Nº de surtos	Nº de surtos com tipos identificados	Tipos %			
				A	B	E	Outros ^a
Japão	1951-84	96	96	2	2	96	0
Canadá	1971-85	67	64	3	9	88	0
EUA ^c	1971-85	210	193	63	23	14	0
Alasca	1971-85	35	33	15	15	70	0
Dinamarca	1971-85	11	9	11	0	78	11(F)
Noruega	1962-78	15	15	0	47	47	6(F) ^b
Bélgica	1982-84	7	7	0	57	14	29(B+C)
RFA	1971-82				>90		
França	1978-84	115	114	0	96	3	1(AB)
Espanha	1969-83	30	30	0	100	0	0
Itália	1979-83	239 ^d	15	20	60	7	13(A+B)
Tchecoslo- váquia	1979-84	17	6	17	83	0	0
Polônia	1979-83	2390 ^d	1279 ^d	2	96	2	0
URSS	1958-64	95	45	33	38	29	0
Irã	1972-74	63	63	0	3	97	0
China	1958-83	986	733	93	5	1	<1(A+B)
Argentina	1970-80	20	14	100	0	0	0

a - Em parênteses, tipo(s) identificado(s)

b - Tipo F suspeito

c - Alasca incluído

d - Casos (não surtos)

Fonte: HAUSCHILD (1989)

QUADRO 5. Alimentos envolvidos em surtos de botulismo.

Local	Período	Nº de surtos com alimentos identificados	Alimentos (%)				Fontes (%)	
			Carnes	Pescados	Vegetais	Outros	Caseiros	Comerciais
Japão	1951-84	94	0	99	1	0	98	2
Canadá	1971-85	63	70	22	8	0	97	3
EUA ^C	1971-85	183	14	17	60	9	90	10
Alasca	1971-85	33	45	55	0	0	100	0
Dinamarca	1951-84	11	27	73	0	0	—	—
Suécia	1969-84	6	17	83	0	0	83	17
Bélgica	1982-84	5	60	20	20	0	60	40
RFA	1971-82	—	>75	—	—	—	—	—
França	1978-84	83	86	5	7	2	88	12
Espanha	1969-83	24	42	0	58	0	92	8
Itália	1979-83	13	8	8	77	8	—	—
Tchecoslo- vália	1979-84	14	72	7	14	7	100	0
Hungria	1961-85	58	67	0	3	29	100	0
Polónia	1979-83	2434 ^a	87	11	2	0	6	32
URSS	1958-64	83	17	67	16	0	—	—
Irã	1972-74	63	3	97	0	0	—	—
China	1958-83	958	10	0	86	4	—	—
Argentina	1922-80	30	3	10	73	13	77	23

a - Casos (não surtos)

Fonte: HAUSCHILD (1989)

2.6. INCIDÊNCIA DE *Clostridium botulinum* EM CARNES E DERIVADOS

A incidência de esporos de *C. botulinum* em carnes frescas e em produtos cárneos, de acordo com as escassas pesquisas relatadas até o presente, especialmente nos Estados Unidos, Canadá e Grã-Bretanha, é relativamente baixa. Porém, com o aprimoramento da metodologia e o aumento do peso de cada amostra, uma incidência mais elevada pode ser esperada (SOFOS *et al.*, 1979).

Nos Estados Unidos e Canadá, as pesquisas envolvendo uma variedade de produtos cárneos crus ou semi-conservados indicam a ordem de 0,1 a 1,0 esporo de *C. botulinum* por kg de produto cárneo (GREENBERG *et al.*, 1966, TACLINDO *et al.*, 1967, INSALATA *et al.*, 1969, ABRAHAMSSON, RIEMANN, 1971, HAUSCHILD, HILSHEIMER, 1980, HAUSCHILD, HILSHEIMER, 1983).

GREENBERG *et al.* (1966) realizaram uma ampla pesquisa em carnes cruas de bovinos, suínos e aves coletadas em plantas de processamento dos Estados Unidos e Canadá. Do total de 2.358 amostras analisadas, somente de uma amostra de frango, proveniente de Colúmbia Britânica (Canadá), foi isolado *C. botulinum* tipo C. A incidência observada neste estudo foi significativamente mais baixa que a observada em estudos subseqüentes e pode estar associada ao uso de um meio seletivo (ágar sulfito polimixina sulfadiazina) no processo de isolamento. Ainda com referência a esta pesquisa, deve-se notar que foi retirado um pequeno inóculo (3,0 g) de um elevado número de amostras, o que naturalmente diminui a freqüência de amostras positivas. A quantidade total de carne inoculada foi de aproximadamente 7,0kg.

Um levantamento realizado na Califórnia (EUA) por TACLINDO *et al.* (1967) em 73 amostras de carnes processadas prontas para o consumo ("luncheon meats") e em 17 amostras de embutidos ("sausages") proporcionou apenas um resultado positivo para *C. botulinum* tipo B em carne processada. A quantidade total de carne inoculada neste estudo foi de aproximadamente 2,4 kg (em 12 alíquotas de 2g por amostra) e o meio de cultura utilizado foi o meio de carne cozida.

THATCHER *et al.* (1967) relataram que em pesquisa realizada no Canadá, com amostras coletadas a nível de varejo, o *C. botulinum* não foi encontrado em 436 amostras de vários tipos de produtos cárneos fatiados, embalados a vácuo, enquanto três do total de 400 amostras de pescado embalado congelado continham esporos. O peso total das amostras examinadas não foi relatado nesta pesquisa.

INSALATA *et al.* (1969), em pesquisa realizada nos Estados Unidos, observaram uma amostra positiva para *C. botulinum* tipo B em salsicha entre 70 amostras de produtos cárneos embalados a vácuo. O peso total das amostras examinadas não foi relatado e o meio de cultura utilizado foi o recomendado por DUFF citado em INSALATA *et al.* (1969).

ABRAHAMSON, RIEMANN (1971) examinaram amostras de produtos cárneos semiconservados e coletados em supermercados de Davis, Califórnia (EUA). A toxina botulínica tipo A foi detectada em cinco do total de 100 amostras de presunto cozido examinadas e o *C. botulinum* foi isolado de duas amostras; uma amostra de carne de peru defumada, do total de 41 amostras examinadas, continha *C. botulinum* tipo B. Nesta pesquisa, os referidos autores examinaram, no total, aproximadamente 11,3kg de produtos cárneos, em 372 amostras de 30g inoculadas em meio de carne moída adicionado de cisteína.

ROBERTS e SMART investigaram a incidência de *C. botulinum* em carne de suínos crua, em pedaços de "bacon" e em "bacon" embalado, na Grã-Bretanha. Em fase preliminar de estudos, ROBERTS, SMART (1976), detectaram 10 amostras positivas para *C. botulinum* tipo B e uma para tipo A em 263 amostras de "bacon" examinadas, utilizando alíquotas de 25g; em outra fase subsequente, amostras de 175g foram utilizadas e 19 amostras foram positivas para o tipo A, em 26 amostras analisadas (ROBERTS, SMART, 1977). A incidência de esporos encontrada parece ser mais elevada do que a relatada nos Estados Unidos e Canadá.

HAUSCHILD, HILSHEIMER (1980) realizaram uma vasta pesquisa sobre a incidência de *C. botulinum* em "bacon", no Canadá. Do total de 104 amostras, em quadruplicata, cada uma de 75g, apenas uma das quadruplicatas se tornou tóxica. Tentativas repetidas de novo isolamento nas outras três amostras do mesmo produto não

permitiram detecção de toxina, indicando, assim, um baixo nível de contaminação. A toxina produzida na amostra positiva foi neutralizada apenas por uma combinação dos antisoros A e B. Desconsiderando a possibilidade de contaminação por ambos os tipos, os autores consideraram que o microrganismo poderia ser uma cepa rara produtora de mais de um tipo de toxina. O Número Mais Provável (NMP) de esporos de *C. botulinum* foi estimado estatisticamente em 0,064 por kg de "bacon". Em estudos subsequentes, utilizando outros produtos cárneos semiconservados, HAUSCHILD, HILSHEIMER (1980) detectaram esporos de *C. botulinum* tipo A em duas amostras de 75g. Nesta pesquisa, 132 amostras foram examinadas. O meio de cultura utilizado pelos autores foi o caldo tripticase-peptona-extrato de levedura-glicose ("TPGY"). Assumindo tal distribuição de esporos entre os produtos analisados, o NMP foi estimado em 0,2 esporos por kg.

No Brasil, foi realizada uma pesquisa sobre a detecção de toxina botulínica e o isolamento de *Clostridium botulinum* e outros clostrídios em produtos cárneos embalados a vácuo, comercializados na região de Ribeirão Preto, SP (SCHOCKEN - ITURRINO *et al.*, 1988). Foram examinadas 1.020 amostras de presuntada (163 amostras), salsicha (198 amostras), pasta de carne com picles (138 amostras), patê de carne (161 amostras), patê de fígado (174 amostras) e carne bovina cozida (186 amostras), inoculadas em meio de carne cozida (CMM, Difco), em volumes de 2ml, a partir da diluição de 20g de amostra em 80ml de solução salina, ou seja, na quantidade de 0,5g de cada amostra. Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram a ausência de toxina botulínica em todas as amostras examinadas e o *C. botulinum* não foi isolado de nenhuma amostra. Outras bactérias do gênero *Clostridium* foram isoladas de 204 (20%) amostras.

2.7. PRINCIPAIS FATORES NO CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE *Clostridium botulinum* EM ALIMENTOS

Para mostrar os principais fatores ou barreiras que controlam o crescimento de *C. botulinum*, elaboramos o Quadro 6, a partir de dados citados por LEISTNER (1986) e HAUSCHILD (1989).

QUADRO 6. Fatores mais relevantes que controlam isoladamente o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* tipos A, B e E.

Fatores	Tipo de <i>C. botulinum</i>	
	A e B proteolítico	E e B não-proteolítico
Acidez (pH)	< ou = 4,6	< ou = 4,8
Concentração de nitrito (a pH 6,0)	> ou = 300 mg/kg	> ou = 200 mg/Kg
Concentração de NaCl	> ou = 10%	> ou = 5,0%
Aa (NaCl como soluto)	< ou = 0,94	< ou = 0,97
Temperatura de refrigeração	< ou = 10°C	< ou = 3°C
Tratamento térmico:		
D100 (esporos)	25 min	0,1 min

Fonte: LEISTNER (1986), HAUSCHILD (1989).

Em algumas conservas de alimentos, o *C. botulinum* é controlado por um único fator, por exemplo, o tratamento térmico de esterilização em alimentos enlatados de baixa acidez, mas, geralmente, o microrganismo é inibido por uma combinação de diversos fatores, alguns deles interagindo. BAIRD PARKER, FREAME (1967) estudaram o efeito combinado da atividade de água (Aa), pH e temperatura no crescimento de *C. botulinum* tipo B. Neste estudo, demonstraram que a Aa mínima para crescimento da bactéria aumenta com a diminuição do valor de pH; não foi observado crescimento com Aa= 0,95 e pH= 7,0 ou Aa= 0,99 e pH= 5,0. LEISTNER (1977) reuniu os fatores relevantes para bloquear o desenvolvimento de *C. botulinum* num conjunto de obstáculos ("hurdles") que podem ser diminuídos ou removidos individualmente, ao passo que outros são aumentados.

O Quadro 7, que elaboramos com nossos dados e de RIEMANN (1973) e HAUSCHILD (1989), mostra diversas interações de barreiras que podem ser usadas.

Em produtos cárneos, numerosas pesquisas têm comprovado que a prevenção do crescimento do *C. botulinum* é uma consequência da combinação dos vários fatores (PIVNICK *et al.*, 1969, RIEMANN *et al.*, 1972, HUSTAD *et al.*, 1973, ROBERTS *et al.*, 1979, HAUSCHILD *et al.*, 1982, TOMPKIN, 1983, ROBERTS, GIBSON, 1986).

A quantidade de nitrito inicialmente adicionada é a principal responsável pela segurança dos produtos cárneos durante a estocagem. O grau de inibição é maior com níveis iniciais mais elevados de nitrito (CHRISTIANSEN *et al.*, 1973, TOMPKIN, *et al.*, 1977). A queda do nível de nitrito em produtos cárneos tem início logo após sua adição ao produto e é contínua, dependendo de fatores tais como: composição do produto, pH, processamento e temperatura de estocagem. O nitrito residual também exerce algum efeito na inibição do *C. botulinum* (PIERSON, SMOOT, 1982).

O mecanismo de ação inibitória do nitrito sobre os vários microrganismos não é bem conhecido, mas sabe-se que é a forma não-dissociada do ácido nitroso (HNO₂), que é o composto ativo (INGRAM, 1974, citado por PIERSON, SMOOT, 1982). No *C. botulinum*, o nitrito foi demonstrado reagindo nas ligações ferro-enxofre de algumas proteínas, por exemplo, ferredoxina, para formar complexos ferro-óxido nitrosos, inibindo

o sistema fosforoclástico, o qual envolve a conversão do piruvato a acetil-fosfato, transferência de elétrons e formação de ATP (REDDY *et al.*, 1983, WOODS, WOOD, 1982).

PIVNICK *et al.* (1969), trabalhando com carne de porco curada, inoculada com esporos de *Clostridium botulinum* tipos A e B, na concentração de 10^5 esporos/g de carne, concluíram que concentrações de cloreto de sódio acima de 6,1% são necessárias para prevenir a produção da toxina botulínica, na ausência de nitrito, enquanto níveis de cloreto de sódio de 5,8 a 6,1%, na fase aquosa do produto com 75mg de nitrito de sódio/kg ou 4,9% de sal com 150mg de nitrito/kg são necessários para prevenir a formação de toxina.

HUSTAD *et al.* (1973) estudaram o efeito do nitrito e do nitrato de sódio na formação de toxina botulínica, em salsichas inoculadas com 620 esporos de *C. botulinum* tipos A e B por grama, incubadas a 27°C durante 56 dias. Seis diferentes concentrações de nitrito de sódio (0, 50, 100, 150, 200 e 300mg/kg) e quatro níveis de nitrato de sódio (0, 50, 150 e 450mg/kg) foram utilizados na formulação das salsichas. Quando não foi adicionado nitrito, amostras tóxicas foram detectadas após 14 dias a 27°C; no nível mais baixo de nitrito (50mg/kg), foi encontrada uma amostra tóxica após 56 dias de incubação; níveis mais elevados de nitrito inibiram completamente a produção de toxina durante o período de 56 dias de incubação a 27°C. Estes autores relataram que, após a adição do nitrito à carne, a concentração inicial deste sal diminui em média 16%, ocorrendo, ainda, uma redução adicional de aproximadamente 51% durante o processamento, restando, ao final do processamento, em média, 33% da quantidade inicialmente adicionada. Ainda que o nível de nitrito residual tenha diminuído para 3mg/kg durante a estocagem, não foi detectada, durante aquele período, toxina botulínica em amostras inicialmente formuladas com 100mg de nitrito/kg. O nitrato de sódio mostrou-se pouco eficiente na prevenção da toxigenese.

HAUSCHILD *et al.* (1982) inocularam 10^4 esporos de *C. botulinum* tipos A e B em pasta de fígado embutida em filmes de poliéster, formulada com 0, 50, 100 e 150mg de nitrito de sódio/kg e armazenaram o produto a 27°C. Verificaram que as amostras ficaram

tóxicas ao fim de uma semana, quando os níveis de nitrito eram de 0, 50 e 100mg/kg, as amostras contendo 150mg de nitrito/kg somente ficaram tóxicas ao final de duas semanas de armazenamento àquela temperatura.

Estas diferenças nos períodos de aparecimento de toxina, verificadas nas pesquisas realizadas por Hustad *et al.* (1973) e Hauschild *et al.* (1982) podem ser compreendidas levando-se em consideração o que preconizou ROBERTS, GIBSON (1986): os fatores conhecidos a combinar para controle de *C. botulinum* em produtos cárneos incluem pH do produto, atividade de água do produto, concentração de sal, quantidade de nitrito inicialmente adicionado ao produto e concentração residual, severidade do tratamento térmico aplicado no processamento, temperatura de estocagem, número de esporos presentes no produto, natureza da microbiota competitiva, quantidade de ferro disponível no produto (exemplo: diferentes tipos de carnes) e outros aditivos, como ascorbato, fosfato e nitrato.

QUADRO 7. Métodos de controle de *Clostridium botulinum* utilizados na preservação de alguns tipos de alimentos.

Método de Controle	Destruição dos esporos	Inibição dos esporos	Tipo de alimento
Processamento térmico com $F_0 > 2,4$	+	-	Conservas de baixa acidez ($pH > 4,6$)
Processamento térmico com $F_0 < 2,4$, sal e nitrito	(+)	+	Conservas de carnes curadas estáveis (ex: patê de fígado, patê de presunto)
Pasteurização e pH	-	+	Conservas ácidas ($pH < 4,6$)
Pasteurização, sal, nitrito e refrigeração	-	+	Produtos cárneos curados cozidos perecíveis (ex: salsicha, presunto cozidos)
Pasteurização, pH, sal e refrigeração	-	+	Caviar, queijos frescos
Pasteurização e refrigeração	-	+	Leite, carne de caranguejo enlatada
Defumação, sal, nitrito e refrigeração	-	+	Bacon, frango defumado, tender
Defumação, sal e refrigeração	-	+	Pescado defumado
Sal, nitrito e refrigeração	-	+	Produtos cárneos curados crus perecíveis (ex: lingüiça)
Refrigeração	-	+	Carnes e pescados frescos
Aa (sal, secagem), pH e nitrito	-	+	Produtos cárneos secos fermentados (ex: salame, presunto Parma)
Salga e secagem	-	+	Bacalhau, charque
Salga	-	+	Produtos cárneos salgados (ex: pés e Joelho suínos)

Fontes: RIEMANN (1973), HAUSCHILD (1989), JUNQUEIRA, SERRANO (1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. PRODUTOS ALIMENTÍCIOS

- Mortadelas embutidas em bexigas de bovino ou em filmes de plástico, pesando de 3 a 5kg.

- Presuntos cozidos enformados e prensados, embalados em filmes de plástico, pesando aproximadamente 3kg.

3.1.2. MICRORGANISMOS

- *Clostridium botulinum* tipo A, ATCC 25763, fornecido pelo "Center for Disease Control" - Atlanta, GA, USA.

- *Clostridium botulinum* tipo B proteolítico, ATCC 7949, fornecido pelo "Center for Disease Control" - Atlanta, GA, USA.

- *Clostridium botulinum* tipo B proteolítico, isolado de mortadela tipo "Bologna", coletada no comércio de Campinas.

3.1.3. MEIOS DE CULTURA

- Caldo triptona - peptona - glicose - extrato de levedura ("TPGY"), preparado no laboratório, segundo FDA (1984);

- Ágar anaeróbio - gema de ovo ("EYA"), preparado no laboratório, segundo FDA (1984);

- Ágar ditiotreitól (ágar DDT), preparado no laboratório, segundo HAUSCHILD, HILSHEIMER (1977);

- Ágar figado de vitela com gema de ovo, ("LVA") Difco, de acordo com FDA (1984);

- Meio de carne cozida ("CMM"), preparado no laboratório, segundo FDA (1984);

- Ágar Wynne com gema de ovo ("WA-EY") preparado no laboratório, segundo HAUSCHILD, HILSHEIMER (1977);

- Meio de esporulação de Schmidt, preparado no laboratório, segundo HAUSCHILD *et al.* (1975).

3.1.4. EQUIPAMENTOS

- Estufas incubadoras reguladas à temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e $30^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, "Fanem", modelo 347;

- Homogeneizador de pistões, "Seward Medical", "Stomacher Lab, Blendor";

- Centrífuga refrigerada a $4^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ "Beckman", modelo J2-21;

- Microscópio de contraste de fase, "Karl Zeiss", modelo "Standart/6";

- Higrômetro elétrico, marca "Novasina", modelo EEJA 3/Bag, com câmara modelo 4-TEBO;

- Potenciômetro para medida de pH, marca "Micronal", modelo B-374;

- Espectrofotômetro, "Milton Roy Company", modelo "Spectronic 20";

- Termopar mineral, "ECIL", MS11/T-S-00/304-30-S 1000/PL11/00/F-1500 (25-), com registrador de 6 pontos, "FAC-400 B Multi-thermometer".

- Jarras para obtenção de anaerobiose em atmosfera de hidrogênio, conforme descrito em FUTTER, RICHARDSON (1971).

- Outros equipamentos de uso comum.

3.1.5. OUTROS

- Camundongos tipo "Swiss" (*Mus musculus*), fêmeas, pesando aproximadamente 20g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP;

- Antitoxinas de *Clostridium botulinum* (tipos A,B,C,D,E,F,G e polivalentes), fornecidas pelo "Center for Disease Control" - Atlanta, GA, USA;

- Tripsina 1:250, Difco, ref. 0152-13;

- Outros materiais de uso corrente em análises microbiológicas e físico-químicas.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. PESQUISA I: INCIDÊNCIA DE *Clostridium botulinum* EM MORTADELA E PRESUNTO

3.2.1.1. AMOSTRAGEM

Foram coletadas durante dez meses consecutivos, no varejo do Município de Campinas, 25 amostras de mortadela e 25 amostras de presunto cozido de aproximadamente 500g cada uma. As amostras de mortadela pertenceram a 10 marcas comerciais diferentes e as de presunto a 8 marcas. As marcas estudadas foram determinadas ao acaso, através de sorteio durante a coleta das amostras. A temperatura interna dos produtos foi determinada, no momento da coleta com o auxílio de termômetro de mercúrio. As amostras, cortadas com a faca do comerciante e acondicionadas em sacos plásticos estéreis, foram imediatamente transportadas ao laboratório em caixa de isopor com gel congelado; a seguir foram retiradas dos plásticos em cabine de fluxo

laminar e, após eliminação da camada superficial, que entrou em contato com a faca do comerciante, divididas em quatro porções de 75g (subamostras), para exame microbiológico. Também foram retiradas duas amostras de aproximadamente 100g para análises físico-químicas.

3.2.1.2. INCIDÊNCIA DE ESPOROS DE *C. botulinum*

a) Detecção de esporos produtores de toxinas

Duas subamostras de 75g foram adicionadas de 200ml de caldo "TPGY", à temperatura de 75°C. Em continuação foram desintegradas em homogeneizador de pistões, durante 1 minuto. Posteriormente, os homogeneizados foram transferidos para frasco de vidro com tampa rosqueável e adicionados de 400ml do mesmo caldo a 75°C, perfazendo um volume total de 600ml de caldo "TPGY". Para a ativação de esporos eventualmente presentes e destruição de formas vegetativas, os frascos contendo os homogeneizados foram aquecidos a 75°C durante 20 minutos, em banho-maria, e imediatamente resfriados em banho de água com gelo picado. A seguir, foram incubados a 35°C durante 7 dias.

Após a incubação, foram removidos asepticamente de cada frasco aproximadamente 15ml de homogeneizado do alimento em caldo "TPGY" e transferidos para tubos de centrifuga, seguidos de centrifugação a 12.000 x g, durante 20 minutos.

Em continuação, dois camundongos foram injetados intraperitonealmente, cada um com 0,4ml de sobrenadante. Outra alíquota de 1,0ml do mesmo sobrenadante foi adicionada de 0,25ml de solução estéril de tripsina a 0,5% e mantida à temperatura de 35°C durante 30 minutos; posteriormente, 0,5ml desta suspensão também foi injetada em dois camundongos. Uma terceira alíquota de 1,2ml do sobrenadante foi aquecida à ebulição durante 10 minutos, com o objetivo de inativar a toxina eventualmente presente e após resfriamento em banho de água fria, foram injetados 0,4ml em dois camundongos.

Os animais injetados foram mantidos sob observação por um período máximo de 4 dias, visando constatar sintomas de botulismo.

Os resultados foram considerados presuntivamente positivos, quando houve morte dos camundongos inoculados (2/2 ou pelo menos 2/4) com os sobrenadantes não-aquecidos e sobrevivência daqueles inoculados com os sobrenadantes submetidos a aquecimento.

b) Ensaios confirmativos da presença de toxina e isolamento do *C. botulinum*

A partir das amostras presuntivamente positivas foram realizadas provas confirmativas do tipo de toxina botulínica presente. Para tanto, 1,0ml do sobrenadante presuntivamente positivo foi adicionado de 0,25ml de antitoxina polivalente e incubado a 35°C durante 30 minutos; a seguir, dois camundongos foram injetados intraperitonealmente com 0,5ml do líquido, e mantidos em observação durante 4 dias. A prova foi considerada positiva quando os camundongos injetados com o sobrenadante adicionado da antitoxina polivalente sobreviveram.

Finalmente, para a identificação do tipo de toxina botulínica presente, foram repetidos os testes de neutralização "in vitro", desta feita com antitoxinas monovalentes A, B, C, D, E, F e G, e inoculação em camundongos. A identificação do tipo de *C. botulinum* foi conseguida quando houve sobrevivência do par de camundongos que foi injetado com sobrenadante neutralizado com uma das antitoxinas monovalentes e morte de todos os demais.

Para isolamento do *C. botulinum*, a partir das subamostras confirmadas positivas, as suspensões de alimento em caldo "TPGY" obtidas em "3.2.1.2a" foram inoculadas por estrias em superfície dos meios "LVA", adicionadas de gema de ovo, e "EYA", seguidos de incubação a 35°C por 48h., em atmosfera anaeróbia de hidrogênio. Após incubação, foram isoladas colônias com uma fina camada superior brilhante por cima e ao redor, de aparência aperolada, e transferidas para meio "CMM". Após incubação a 35°C durante 3 dias, as culturas isoladas foram mantidas no mesmo meio e armazenadas sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.3. INCIDÊNCIA DE ESPOROS E CÉLULAS VEGETATIVAS

Duas subamostras de 75g remanescentes das quatro obtidas em "3.2.1.1." foram submetidas aos procedimentos descritos no item "3.2.1.2.", com exceção do tratamento térmico a 75°C.

3.2.1.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Duas alíquotas de aproximadamente 100g de cada amostra coletada (item "3.2.1.1.") foram analisadas, em paralelo, para determinar:

- a) pH, através de potenciômetro elétrico.
- b) Atividade de água, através de higrômetro elétrico
- c) Concentração de cloreto de sódio, segundo WILLIAMS (1984).
- d) Umidade, de acordo com o Instituto Adolfo Lutz - IAL (1985).
- e) Concentração de nitrito de sódio, de acordo com LARA *et al.* (1978).

3.2.2. PESQUISA II: AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE PRODUÇÃO DE TOXINA EM MORTADELA E PRESUNTO

3.2.2.1. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS E CONTAGEM

Para preparação das suspensões de esporos de *C. botulinum* tipos A e B (ATCC) e do microrganismo isolado na pesquisa I, foram usados os procedimentos descritos por HAUSCHILD *et al.* (1975), utilizando meio de esporulação de Schmidt. A contagem dos esporos nas suspensões estocadas foi realizada usando meio "WA-EY" e inoculação em profundidade, segundo descrito por HAUSCHILD, HILSHEIMER, (1977).

3.2.2.2. PREPARAÇÃO DE PRESUNTO COZIDO E DE MORTADELA CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE COM ESPOROS DE *C. botulinum*

a) Mortadela e presunto foram preparados em usina piloto de carnes, de acordo com formulação e técnica de fabricação industrial mais comum. Para a formulação

da mortadela foram utilizados os seguintes ingredientes: paleta bovina (49,73%) paleta suína (8,00%); toucinho (14,00%); gelo (20,00%); sal (1,60%); nitrito de sódio (0,02%); eritorbato de sódio (0,05%); mistura comercial de fosfato (0,50%); especiarias (0,70%); alho "in natura" (0,40%) e amido de milho (5,00%). Na formulação do presunto foram utilizados: pernil suíno (82,03%); água gelada (15,00%); sal 1,60%; nitrito de sódio (0,02%); eritorbato de sódio (0,05%); mistura comercial de fosfatos para presunto (0,50%); especiarias (0,50%) e açúcar (0,30%).

b) A massa de mortadela foi embutida em tripa artificial, incolor, sem impregnação interna, com diâmetro de 80mm ("Hoechst"), resultando em 20 unidades de aproximadamente 700g cada uma. O presunto foi acondicionado em 10 fôrmas de aço inoxidável revestidas internamente de filme plástico de polietileno de alta densidade, em porções de 700g, aproximadamente.

c) Após o embutimento da mortadela e antecedendo a fase de fechamento das fôrmas de presunto, as unidades dos produtos foram injetadas na região central e no sentido longitudinal, com 1ml de suspensão dos três tipos de *C. botulinum* citados no item "3.1.2", misturados em partes iguais, perfazendo 10^4 esporos/ml, aproximadamente. A injeção foi realizada com o auxílio de seringa descartável de 10ml e agulha de 25cm de comprimento, sendo o volume inoculado distribuído ao longo das peças.

d) A seguir, os produtos foram submetidos a cozimento, em vapor fluente. No caso do presunto, o cozimento foi escalonado iniciando-se com vapor a 60°C e aumentando 5°C de 30 em 30 minutos, até atingir temperatura de 80°C. Esta temperatura foi mantida até se obter uma temperatura final interna de 72°C. Para a mortadela foi realizada secagem até uma temperatura interna de 50°C \pm 3°C, seguida de cozimento escalonado em vapor fluente da seguinte maneira: 60-70°C/15 minutos; 75°C/15 minutos e 80-85°C até atingir temperatura interna de 72°C. Após cozimento, os produtos foram refrigerados, primeiro em água gelada e a seguir sob refrigeração a 4°C.

3.2.2.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PRODUTOS PREPARADOS, NÃO CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE

Amostras de mortadela e presunto foram submetidas às análises físico-químicas descritas em "3.2.1.4."

3.2.2.4. PRODUÇÃO E DETECÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA

Após resfriamento, os produtos inoculados foram estocados à temperatura de 30°C. Após 5, 8, 12, 15, 21 e 28 dias de estocagem foram coletadas três mortadelas e de cada uma foram retiradas duas amostras de aproximadamente 50g, da parte central, abrangendo a região inoculada. Para presunto, foram retiradas, aos 2, 5, 8, 12 e 15 dias de estocagem, três amostras de aproximadamente 50g de três peças diferentes envolvendo a região inoculada. Todas as amostras foram examinadas quanto à presença de toxina botulínica, de acordo com a técnica preconizada pelo CDC (1979).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PESQUISA I: INCIDÊNCIA DE *Clostridium botulinum* EM MORTADELA E PRESUNTO

Foi evidenciada toxina botulínica apenas em uma das 100 subamostras de mortadela examinadas. Esta subamostra pertencia ao par destinado à pesquisa da incidência de esporos e células

vegetativas (item 3.3.1.3). Na outra subamostra deste par e no par de subamostras submetidas à ativação térmica para pesquisa de esporos (item 3.2.1.2) não foi detectada toxina botulínica. Tentativas repetidas de isolamentos do microrganismo em meio "LVA" adicionado de gema de ovo e em meio "EYA" e inoculações em camundongos, a partir destas três subamostras, não apresentaram positividade.

A eficiência do método de detecção de esporos utilizado na pesquisa foi estudada por HAUSCHILD, HILSHEIMER (1980). Estes autores inocularam artificialmente esporos de *C. botulinum* em amostras de "bacon" e demonstraram que cerca de 40% dos esporos eram recuperados a partir de subamostras não aquecidas e 80% a partir de subamostras submetidas a aquecimento a 75°C por 20 minutos, para ativação dos esporos. Deste modo, a metodologia aplicada em nossa pesquisa permite evidenciar um maior número de esporos dormentes e também células vegetativas do *C. botulinum*. O fato de haver três subamostras negativas para *C. botulinum* e apenas uma positiva dentro da mesma amostra é aceitável desde que era esperado um baixo nível de contaminação dos produtos por este microrganismo.

O *C. botulinum* detectado na subamostra tóxica de mortadela foi identificado como sendo do tipo B.

O Número Mais Provável (NMP) de *C. botulinum* foi calculado de acordo com HAUSCHILD, HILSHEIMER (1983), através da seguinte equação desenvolvida por HALVORSON, ZIEGLER citado por HAUSCHILD, HILSHEIMER (1983).

$$NMP = \frac{1}{a} \ln \frac{N}{Q}$$

onde N = número total de subamostras

Q = número de subamostras negativas

a = peso de cada subamostra em kg.

Uma vez que a produção de toxina foi evidenciada em uma subamostra das 50 não-aquecidas, o NMP de *C. botulinum*/kg de produto foi estimado em 0,27.

Nas 100 subamostras de presunto cozido não foi evidenciada presença de *C. botulinum*. Neste caso, foi estimado o NMP do microrganismo/kg de produto como sendo inferior a 0,13.

Comparando-se os resultados obtidos com os relatados em estudos realizados por pesquisadores de outros países, verifica-se maior similaridade com os encontrados na América do Norte.

A partir de pesquisa realizada por GREENBERG *et al.* (1966) em carnes cruas, não industrializadas, HAUSCHILD (1989) pôde determinar a incidência de 0,14 NMP de *C. botulinum*/kg. De forma análoga, HAUSCHILD (1989), a partir de pesquisas de TACLINDO *et al.* (1967), ABRAHAMSSOM, RIEMANN (1971) e HAUSCHILD, HILSHEIMER (1983), estimou em produtos cárneos curados, uma incidência de 0,62; 0,54 e 0,20 NMP de *C. botulinum*/kg, respectivamente. Em bacon embalado a vácuo, HAUSCHILD, HILSHEIMER (1980) encontraram o NMP de 0,06 *C. botulinum*/kg. Ainda no Canadá, THATCHER *et al.* (1967) examinaram 436 amostras de vários tipos de produtos cárneos industrializados, fatiados e embalados a vácuo e não detectaram *C. botulinum* nesta pesquisa, o peso das amostras não foi relatado.

Por outro lado, na Grã-Bretanha, a incidência de *C. botulinum* em carne suína não industrializada e em "bacon" embalado a vácuo foi mais elevada, alcançando, em média, valores de 2,56 e 3,33, respectivamente (HAUSCHILD, 1989).

No Brasil, enquanto nós pesquisamos 100 subamostras de 75g num total de 7,5kg de cada produto estudado, SCHOCKEN-ITURRINO *et al.* (1988) examinaram 1020

amostras de produtos cárneos variados, embalados a vácuo e usaram amostras de 0,5g, perfazendo um total de 510g dos produtos inoculados. Estes autores não evidenciaram a presença de *C. botulinum*. Este fato pode talvez em parte ser atribuído à utilização de amostras com peso menor de produto. Aplicando a equação de HAVORSON e ZIEGLER, podemos estimar nesta pesquisa o NMP como sendo inferior a 1,96 por kg de produto.

Nos Quadros 8 e 9 estão contidos os resultados obtidos nas análises físico-químicas realizadas nas 25 amostras de mortadela e presunto coletadas. A temperatura dos produtos e o tempo de estocagem até o momento da coleta no comércio também podem ser observados nos mesmos quadros.

Quadro 8 - Valores obtidos nas análises físico-químicas das 25 amostras de mortadela coletadas no comércio.

Amostra	Temperatura de coleta (°C)	Tempo de Estocagem (dias)	pH *	Aa *	NaCl* (%)	Umidade* (%)	NaNO ₂ residual (mg/Kg)
M.1	11,0	9	6,6	0,969	1,98	54,17	50,0
M.2	7,0	49	6,4	0,955	3,00	49,91	26,8
M.3	12,0	5	6,3	0,970	2,49	54,28	15,0
M.4	3,5	13	6,4	0,985	2,40	53,39	24,0
M.5	22,0	20	6,3	0,958	2,92	51,55	5,5
M.6	17,0	4	6,1	0,975	2,34	64,25	16,3
M.7	4,5	22	5,5	0,934	2,54	48,90	2,5
M.8**	2,0	22	6,4	0,944	2,59	50,75	13,9
M.9	25,5	1	6,1	0,943	2,47	61,95	17,5
M.10	18,5	26	6,5	0,937	2,97	47,80	22,3
M.11	5,0	11	6,5	0,971	2,70	49,45	37,0
M.12	7,5	40	6,0	0,931	3,25	46,70	6,4
M.13	9,0	7	6,4	0,954	2,67	51,90	20,1
M.14	11,0	18	6,5	0,954	2,74	58,85	51,4
M.15	30,0	28	6,2	0,939	3,23	45,95	2,4
M.16	4,5	6	6,1	0,968	3,18	55,94	16,4
M.17	11,0	5	5,2	0,954	2,86	57,33	5,1
M.18	11,5	19	6,0	0,964	2,74	48,75	23,0
M.19	26,0	19	6,0	0,954	2,66	47,70	22,4
M.20	6,5	11	6,1	0,961	2,44	51,97	33,7
M.21	17,0	4	6,1	0,968	2,34	64,44	73,0
M.22	25,0	11	6,1	0,961	2,34	54,44	11,4
M.23	9,0	–	6,1	0,963	2,56	53,13	24,2
M.24	21,5	20	6,2	0,957	3,03	52,99	23,1
M.25	7,0	27	6,3	0,960	2,80	52,38	32,9

* Médias de 2 repetições.

** Amostra com presença de *Clostridium botulinum*

Quadro 9 - Valores obtidos nas análises físico-químicas das 25 amostras de presunto coletadas no comércio.

Amostra	Temperatura de coleta (°C)	Tempo de Estocagem (dias)	pH *	Aa *	NaCl* (%)	Umidade* (%)	NaNO ₂ residual (mg/Kg)
P.1	12,0	12	6,6	0,977	2,18	77,33	86,5
P.2	6,0	66	6,7	0,964	2,40	76,72	4,5
P.3	14,0	27	6,3	0,975	2,02	70,67	84,0
P.4	5,0	14	6,3	0,988	2,02	71,24	45,0
P.5	2,0	21	6,1	0,952	1,47	69,05	11,0
P.6	7,0	7	6,1	0,977	2,09	73,75	68,0
P.7	6,0	60	6,4	-	2,16	76,50	33,0
P.8	4,0	11	6,4	0,968	1,93	73,45	84,4
P.9	3,5	14	6,6	0,954	2,34	75,85	94,0
P.10	11,5	46	6,5	0,954	1,75	70,95	70,1
P.11	4,0	25	6,2	0,974	2,11	72,05	85,7
P.12	8,0	46	6,3	0,972	2,21	68,55	51,4
P.13	0,5	42	6,4	0,974	2,32	66,85	67,0
P.14	12,0	29	6,5	0,963	1,98	73,55	92,0
P.15	14,0	117	6,5	0,961	2,37	70,57	40,0
P.16	5,5	21	6,2	0,975	1,99	72,72	89,7
P.17	11,0	11	6,4	0,973	2,23	76,16	129,7
P.18	5,5	35	6,2	0,973	2,07	76,62	83,0
P.19	6,0	29	6,2	0,973	1,84	71,15	96,4
P.20	5,5	13	6,1	0,971	2,05	69,92	96,4
P.21	2,5	11	6,2	0,970	2,07	72,21	102,0
P.22	6,0	11	6,2	0,968	2,36	74,60	122,0
P.23	19,0	6	6,2	0,977	2,14	70,31	129,0
P.24	7,0	7	6,2	0,969	2,35	75,44	95,6
P.25	2,5	29	6,3	0,968	2,14	72,69	95,6

* Médias de 2 repetições.

No que se refere à temperatura de estocagem de mortadela, as empresas produtoras, para satisfazerem à resolução CISA N° 10 de 31 de julho de 1984 (ABIA, 1989), indicam, no rótulo, que o "produto mantém suas melhores características se conservado até 22°C, em ambiente seco". Dentre as amostras por nós coletadas no comércio, pode-se observar, no Quadro 8, que quatro (16%) se encontravam expostas à venda em temperatura acima do limite de conservação indicado (amostras M.9, M.15, M.19 e M.22), sendo que a maior temperatura de comercialização verificada durante a coleta das amostras foi de 30°C. Não foi possível determinar o tempo durante o qual estes produtos permaneceram estocados nas respectivas temperaturas. A partir da data de produção, verificamos a idade das amostras coletadas (tempo de estocagem no Quadro 8) e observamos que duas amostras de mortadela (8%) se encontravam à venda fora do prazo de validade de 30 dias, estabelecido pelas empresas produtoras (amostras M.2 e M.12).

Para o presunto cozido, as empresas produtoras recomendam que seja mantido resfriado à temperatura de 8-10°C, sendo nestas condições válido por dois meses. No Quadro 9, verifica-se que, das amostras por nós coletadas, sete (28%) se encontravam à venda em temperatura acima do limite recomendado (amostras P.1, P.3, P.10, P.14, P.15, P.17 e P.23) e duas amostras (8%) haviam ultrapassado o prazo de validade indicado pelos produtores (amostras P.2 e P.15).

Geralmente mortadela e presunto são vendidos fatiados no estabelecimento comercial, não possibilitando, desta forma, ao consumidor saber se está adquirindo um produto dentro do prazo de validade. Estes valores elevados de temperatura e tempo de estocagem precisam ser vistos com preocupação. A correta preservação do produto e a inibição da produção de toxina botulínica pelo microrganismo eventualmente presente dependem, em grande parte, do controle da temperatura e do tempo de estocagem, que devem obedecer às recomendações dadas pelo fabricante e que constam do rótulo do produto. Falhas neste sentido, como as constatadas no presente trabalho, demonstram o desconhecimento dos comerciantes da importância destes fatores (especialmente da temperatura) no controle do desenvolvimento microbiano e/ou produção de toxinas, que podem pôr em risco a saúde do consumidor.

Por comparação entre os dois produtos cárneos estudados, observamos, nos Quadros 8 e 9 que, quanto ao pH, as amostras de mortadela e presunto encontram-se na faixa de 6,1 - 6,6. Valores inferiores a 6,1 foram observados somente na mortadela, em três amostras com pH 6,0 (M.12, M.18 e M.19) e em duas amostras com pH 5,5 e 5,2 (M.7 e M.17, respectivamente). O pH limite para crescimento de *Clostridium botulinum* tipos A e B é de 4,6, no mínimo, o que mostra que aqueles valores acima do pH limite não constituem barreira para o desenvolvimento do *C. botulinum*, se considerado isoladamente. Os dados obtidos estão de acordo com o relatado por PIERSON, SMOOT (1982) que mencionam uma média de pH em pesquisas com produtos cárneos curados na faixa de 5,5 a 6,6. Quanto mais baixo o pH, mais efetiva se torna a inibição do *C. botulinum* pelo nitrito de sódio (PIERSON, SMOOT, 1982).

Com relação à atividade de água (Aa) e à concentração de cloreto de sódio, as amostras de mortadela apresentam valores de Aa ligeiramente menores e de concentração salina ligeiramente maiores que os obtidos em presunto.

Considerando o fator Aa isoladamente, apenas quatro amostras de mortadela (M.7, M.10, M.12 e M.15) apresentam valores seguros para o controle do desenvolvimento de *C. botulinum* e produção de toxina.

A maior diferença entre os dois produtos aparece no teor de umidade: na mortadela varia de 45,95% a 64,4% (amostras M.15 e M.21, respectivamente) e no presunto de 66,85% a 77,33% (amostras P13 e P1, respectivamente).

De acordo com a legislação brasileira de alimentos, a adição do nitrito de sódio ou de potássio em carnes curadas só pode ser feita em quantidade tal que, no produto pronto para o consumo, o teor em nitrito não ultrapasse 0,02mg/kg (ABIA, 1989). Desse modo, é comum o emprego de 0,02mg/kg de nitrito de sódio durante a formulação dos produtos cárneos curados, resultando em concentrações residuais geralmente abaixo de 0,02mg/kg nos produtos prontos para o consumo. A queda da concentração de nitrito tem início imediatamente após sua adição à carne e é contínua, sendo afetada pela composição do produto, processamento, pH e temperatura de estocagem (HUSTAD *et. al*, 1973, PIERSON, SMOOT, 1982).

Entre os dois produtos analisados, podemos observar que as mortadelas, em geral, apresentaram valores residuais de nitrito de sódio menores que os presuntos, provavelmente devido às diferenças de composição, processamento térmico e temperatura de estocagem durante a distribuição e a comercialização.

Foi observado que entre amostras dos mesmos produtos, as concentrações de nitrito foram bastante variáveis. Por exemplo, no Quadro 8, a amostra de mortadela M.21, coletada com temperatura de 17°C e quatro dias de estocagem apresentou concentração residual de nitrito de sódio de 73mg/kg, ao passo que nas mesmas condições de estocagem, a amostra M.6 apresentou tão somente 16,3mg/kg deste sal, sugerindo uso de nitrito de sódio de forma diferente, maior na amostra M.21 e em quantidade menor na amostra M.6. Da mesma forma, a amostra de mortadela M.9 com apenas um dia de estocagem a 25,5°C (temperatura superior à recomendada, de 22°C) apresentou 17,5mg/kg de nitrito de sódio residual, também sugerindo uso de pouco nitrito de sódio na sua formulação.

No Quadro 9 destacamos as amostras de presunto P.17 e P.23, que foram coletadas com 11 e 6 dias de estocagem, à temperatura inadequada de 11°C e 19°C e apresentaram concentrações residuais de nitrito de sódio de 129,7mg/kg e 129,0mg/kg, respectivamente. Em ambas as amostras de presunto, os valores de nitrito de sódio apresentam-se notoriamente acima das demais amostras deste produto, sugerindo excesso de uso em suas formulações.

Estes resultados levam-nos a admitir que as indústrias usam quantidades bem diferentes de nitrito de sódio nas suas formulações. Como preconizaram GIBSON *et al.* (1984), a monitoração do nitrito em um produto cárneo durante a distribuição ou comercialização, sem conhecimento da técnica de fabricação e histórico prévio desse produto, fornece-nos pequena informação da quantidade usada pelo produtor.

O pH, Aa, umidade e concentrações de nitrito e de cloreto de sódio são fatores intrínsecos, que juntos contribuem para a conservação de cada produto, sendo, portanto, de pouca validade a discussão isolada de cada fator (LEISTNER, 1977, ROBERTS, GIBSON, 1986).

4.2. PESQUISA II: AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE TOXINA DE *Clostridium botulinum* EM MORTADELA E PRESUNTO, CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE COM ESPOROS.

Os resultados da avaliação da possibilidade de haver toxigênese em mortadela e presunto, contaminados artificialmente com 10^4 esporos de *Clostridium botulinum* tipos A e B / unidade, estão reunidos no Quadro 10.

QUADRO 10. Tempo necessário para ocorrência de toxigênese em mortadela e presunto contaminados artificialmente com esporos de *C. botulinum* e submetidos à estocagem inadequada à temperatura de 30°C.

Produto	Tempo (dias)						
	2	5	8	12	15	21	28
Mortadela	-	0/6 ^(a)	0/6	0/6	0/6	0/6 ^(b)	0/6
Presunto	0/3	0/3	0/3	1/3 ^(b)	2/2 ^(b)	-	-

(a) = n° de amostras tóxicas / n° de amostras inoculadas em camundongos.

(b) = amostras com textura, cor e odor alterados.

Como pode ser observado, não foi evidenciada toxina botulínica nas amostras de mortadela, mesmo após 28 dias à temperatura de 30°C.

No presunto, após 12 dias de estocagem a 30°C, foi detectada presença de toxina botulínica em uma amostra de um grupo de três utilizadas no ensaio (Quadro 10), porém, a amostra já apresentava sinais evidentes de deterioração: textura, cor e odor alterados.

HUSTAD *et al.* (1973), em salsichas inicialmente formuladas com 100mg de nitrito de sódio/kg e inoculadas com 620 esporos/g de *C. botulinum* tipos A e B, não encontraram amostras tóxicas ao fim de 56 dias de estocagem à temperatura de 27°C.

HAUSCHILD *et al.* (1982), trabalhando com pasta de fígado embutida em filme de poliéster, inoculada com 10⁴ esporos/unidade de *C. botulinum* tipos A e B e armazenada também, como na pesquisa anterior, a 27°C, observaram toxigênese após uma semana, quando os níveis de nitrito de sódio na formulação eram 50 e 100mg/kg, e após duas semanas, quando a concentração inicial deste sal era de 150mg/kg; nestes casos, a presença de toxina sempre foi acompanhada de aparecimento de odor pútrido. Como se vê, as possibilidades de ocorrer produção de toxina botulínica são diferentes entre os produtos citados, o que era de se esperar, já que as interações das barreiras existentes nos produtos também são diferentes. Isto nos leva a dizer que sempre que haja fabricação de um novo produto, ou sua modificação, torna-se necessário avaliar o risco de desenvolvimento de toxina e, conforme os casos, reproduzir-se em laboratório os possíveis abusos que poderão ocorrer durante a produção, o transporte e o armazenamento.

No Quadro 11 estão reunidos os resultados das determinações físico-químicas realizados nas amostras de mortadela e presunto, imediatamente após o preparo. Na formulação desses produtos foram utilizados 200mg de nitrito de sódio por kg.

Na mortadela, verificamos (Quadro 11) que a concentração deste sal diminuiu para 87,6mg/kg (ou seja, 43,8% da quantidade inicialmente adicionada) e após a estocagem durante 28 dias a 30°C (Quadro 12) para 1,6mg/kg (0,8% da quantidade inicialmente adicionada).

No presunto, a concentração de nitrito de sódio diminuiu imediatamente após preparo para 94,2mg/kg (47,1%) e ao fim de 15 dias de estocagem (após o aparecimento da toxina) não foi mais detectada a presença de nitrito de sódio (Quadro 12).

HUSTAD *et al.* (1973), ainda que em produtos diferentes daqueles que elaboramos, também relataram uma diminuição substancial do nitrito: em salsichas inicialmente

formuladas com 100mg de nitrito de sódio/kg, estes autores verificaram, após o processamento, redução em aproximadamente 33% da quantidade adicionada na formulação. Após estocagem à temperatura de 27°C durante 36 dias, o nível residual de nitrito de sódio era de 3 mg/kg de salsicha.

A quantidade de nitrito inicialmente adicionada na formulação é a principal responsável pelo controle do *C. botulinum*, como já visto. A redução do teor deste sal é esperada após fabricação do alimento e durante a estocagem, em virtude do processamento, da composição química do alimento e da temperatura em que vem sendo mantido.

QUADRO 11. Determinações físico-químicas realizadas em amostras de mortadela e presunto imediatamente após preparo dos produtos (média de duas repetições).

Produto	pH	NaNO ₂ (mg/Kg)	NaCl %	Umidade %	Aa
Mortadela	6,5	87,6	1,75	62,4	0,976
Presunto	6,3	94,2	1,75	73,6	0,974

QUADRO 12. Determinação de nitrito de sódio em amostras de mortadela e presunto após estocagem à temperatura de 30°C (média de duas repetições).

Produto	NaNO ₂ residual (mg/kg)	Tempo de estocagem (dias)
mortadela	1,6	28
presunto	0,0	15 ^(a)

(a) aparecimento de toxina.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos:

1. Estima-se a incidência de *Clostridium botulinum* em 0,27NMP/kg de mortadela e inferior a 0,13NMP/kg de presunto.
2. Encontram-se sob revenda produtos em condições inadequadas de temperatura e prazo de validade, que podem pôr em risco a sua segurança. Quatro (16%) amostras de mortadela e sete (28%) amostras de presunto, das 25 amostras coletadas no comércio, estavam à venda em temperatura acima do limite recomendado; duas (8%) amostras de cada um dos produtos coletados estavam fora do prazo de validade.
3. Considerando-se isoladamente os fatores que controlam o desenvolvimento do *C. botulinum*, apenas quatro (16%) amostras de mortadela apresentaram valores seguros para impedir a toxigênese, ou seja, atividade de água $< 0,94$.
4. Observa-se que os produtores usam quantidades bem diferentes de nitrito de sódio nas suas formulações, o que leva a concluir que é necessária uma fiscalização mais acurada nas indústrias.

Nas condições de formulação, processamento e estocagem de nossa pesquisa, a mortadela não desenvolveu toxina botulínica; o presunto desenvolveu toxina quando as condições organolépticas do produto já eram inaceitáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAMSSON, K., RIEMANN, H. Prevalence of *Clostridium botulinum* in semi preserved meat products. **Applied Microbiology**. Washington, v.21, p. 543-544, 1971.
2. ARAP, L., PIMENTEL, E.P., PICCOLO, R.C. *et al.* Surto de botulismo em conserva vegetal caseira, ocorrido no município de São Paulo, em 1990. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, p. 32-34, 1993.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO (ABIA). **Compêndio da legislação de alimentos**. Brasil, v.1, 1989.
4. BANWART, G.L. **Basic Food Microbiology**, Westport, AVI, 1979, 781 p.
5. BONVENTRE, P.F., KEMPE, L.L. Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B. III. Effect of pH and temperature during incubation on growth, autolysis and toxin production. **Applied Microbiology**. Washington, v.7, p. 374-377, 1959.
6. BORROF, D.A., DASGUPTA, R.B. Botulinum toxins. In: KADIS, S., MONTIE, C.T., AJL, J.S. **Microbial Toxin**. New York, N.Y.: Academic Press, 1971. p. 1-62.
7. BOWMER, E.J. Preparation and assay of the International Standard for *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E antitoxins. **Bulletin WHO**, v.29, p. 701-709, 1963.
8. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Botulism in the United States, 1899-1977: Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers**, Washington, DC., U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1979. 41p [(Public Health Service Publication n. (CDC) 74-8279)].

9. CHRISTIANSEN, L.N, JOHNSTON, R.W, KAUTTER, D.A, *et al.* Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. **Applied Microbiology**, 25: 357-362, 1973.
10. DOLMAN, C.E. Botulism as a world health problem. In: LEWIS, R.H., CASSEL, Jr.K. **Botulism**. Washington, DC. U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1964. p. 3-32.
11. EKLUND, M.W. Significance of *Clostridium botulinum* in fishery products preserved short of sterilization. **Food Technology**, Chicago, v.36, n 12, p. 107-112, 115, 1982.
12. ELLIOTT, R.P., CLARK, D.S., LEWIS, K.H. *et al.* **Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration**. 2.ed. Toronto, Canada: International Commiission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), University of Toronto Press, 1978. v.1, 435p.
13. FERREIRA, M.S., NISHOKA, S.A., ALMEIDA, A.B. *et al.* Botulismo: considerações acerca de oito casos ocorridos no triângulo mineiro, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v.19, p. 137-141, 1987.
14. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**, 6.ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1984.
15. FUTTER, B.J., RICHARDSON, G. Anaerobic in jars the quantitative recovery of clostridia. In: SHAPTON, D.A., BOARD, R.G. **Isolation of anaerobes**. London, Academic Press, 1971. p. 81-91.
16. GENIGEORGIS, C.A. Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganism in foods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, California, v.179, n 12, p. 1410-1417, 1981.

17. GIBSON, A.M, ROBERTS, T.A. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized cured meats VI. nitrite monitoring during storage of pasteurized pork slurries. **Journal of Food Technology**, United Kingdom, v.19, p. 29-44, 1984.
18. GIMENEZ, D., CICCARELLI, A.S. Another type of *Clostridium botulinum*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene, Abstracts**, Germany, v.215, p. 221-224, 1970.
19. GREENBERG, R.A., TOMPKIN, R.B., BLADEL, B.O. *et al.* Incidence of mesophilic *Clostridium* spores in raw pork, beef and chicken in processing plants in the United States and Canada. **Applied Microbiology**, Washington, v.14, p. 789-793, 1966.
20. HALL, J.D., McCROSKEY, L.M., PINCOMP, B.J. *et al.* Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinal toxin from an infant with botulism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washiington, v.21, p. 654-655, 1985.
21. HATHEWAY, C.L., McCROSKEY, L.M. Laboratory investigation of human and animal botulism. In: **Biomedical Aspects of Botulism**. New York, NY, USA, **Academic Press**, 1981, p.165-180.
22. HAUSCHILD, A.H.W., ARIS, B.J., HILSHEIMER, R. *Clostridium botulinum* in marinated products. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Canada, v.8, p. 84-88, 1975.
23. _____, HILSHEIMER, R. Enumeration of *Clostridium botulinum* spores in meats by a pour-plate procedure. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.23, n 6, p. 829-832, 1977.
24. _____, _____. Incidence of *Clostridium botulinum* in commercial bacon. **Jounal of Food Protection**, Ames, Iowa, v. 43, p. 564-565, 1980.

25. _____, _____, JARVIS, G. *et al.* Contribution of nitrite to the control of *Clostridium botulinum* in liver sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, Iowa, v.45, p. 500-506, 1982.
26. _____, _____. Prevalence of *Clostridium botulinum* in commercial liver sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, Iowa, v.46, p. 242-244, 1983.
27. _____. *Clostridium botulinum*. In: DOYLE. **Foodborne Bacterial Pathogens**. U.S.A., Marcel Dekker, 1989. p. 111-189
28. HEALTH PROTECTION BRANCH LABORATORIES (HPB). Detection of *Clostridium botulinum* and its toxins in foods. MPA-16, Ottawa, Canada, 1973. 19p.
29. HOBBS, G. CROWTHER, J.S. NEAVES, P. *et al.* Detection and identification methods for food poisoning organisms. **Society for Applied Bacteriology Symposium Series**, San Diego, CA, v.17, p. 151-164, 1982.
30. HOLDEMANN, L.V., BROOKS, J.B. Variation among strains of *Clostridium botulinum*, and related clostridia. In: **US-Japan Conference on Toxic Microorganisms, 1, 1968. Proceedings**. Washington, US: Government Printing Office, 1970. p. 278-286.
31. _____, CATO, E.P., MOORE, W.E.C. **Anaerobe Laboratory Manual**. 4.ed. Backsburg, VA, USA, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
32. HUSTAD, G.O., CERVENY, J.G., TRENK, H. *et al.* Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. **Applied Microbiology**, Washington, v.26, p. 22-26, 1973.
33. INSALATA, N.F., WITZEMAN, S.I., FREDERICKS, G.J. *et al.* Incidence study of spores of *Clostridium botulinum* in convenience foods. **Applied Microbiology**, Washington, v.17, p. 542-544, 1969.

34. INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análises de alimentos, 3. ed. São Paulo, 1985, v.1, 532p.
35. JUNQUEIRA, V.C.A., SERRANO, A.M. *Clostridium botulinum*: cronologia das descobertas, caracterização, manifestações clínicas, diagnóstico e controle. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)**, Campinas, SP, v.24, p.29-39, 1994.
36. KAUTTER, D.A., LYNT, R.K. *Clostridium botulinum*. In: SPECK, M.L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2 ed. Washington, American Public Health Association, 1984. p. 468-482.
37. LAMANNA, C. The most poisonous poison. **Science**, Washington, v.130, p. 763-772, 1959.
38. LARA, W.H., TAKAHASHI, M.Y., SILVEIRA, N. Determinação de nitritos e nitratos em conservas de carne. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.38, p. 161-166, 1978.
39. LEISTNER, L. Hurdle effect and energy saving. In: DOWNEY, W.K. **Food Quality and Nutrition**, London, UK, **Applied Science Public**, 1977, p. 553-557.
40. _____. Nitrate (salpetre) and meat products. Situation in West Germany. **Die Fleischerel**; Germany, v.37, n.4, p. XIV-XVI, 1986.
41. LEITÃO, M.F.F. Pesquisa de *Clostridium botulinum* no Brasil. Ocorrência e importância. **Anais do IV Seminário Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, p. 171-175, 1982.
42. LYNT, R.K., KAUTTER, D.A., SOLOMON, H.M. Differences and similarities among proteolytic and nonproteolytic strains of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, Iowa, v.45, n. 5, p. 466-474, 1982.

43. McCROSKEY, L.M., HATHEWAY, C.L., FENICIA, B. *et al.* Characterization of an organisms that produces type E botulinal toxin but which resembles *Clostridium botulinum* from the feces of an infant with type E botulism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.23, p. 201-202, 1986.
44. MOLLER, V., SCHEIBEL, I. Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Clostridium botulinum*. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, Denmark, v.48, p. 80, 1960.
45. PEREIRA-FILHO, M.J. Diagnóstico biológico do surto de botulismo humano do pronto socorro de Pôrto Alegre. **Medicina e Cirurgia**. v.19, p. 52-111, 1958.
46. PIERSON, M.D., SMOOT, L.A. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, Florida, USA, v.17, p. 141-187, 1982.
47. POUMEYROL, M., BILLON, J., DELILLE, F. *et al.* Intoxication botulique mortelle due à une souche de *Clostridium botulinum* de type AB. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v.13, p. 750-754, 1983.
48. REDDY, D., LANCASTER, J.R. Jr., CORNFORTH, D.P. Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes. **Science**, 221 (4612), p. 769-770, 1983.
49. RIEMANN, H. Safe heat processing of canned cured meats with regard to bacterial spores. **Food Technology**, Chicago, v.17, n. 1, p. 39-49, 1963.
50. _____, LEE, W.H., GENIGEORGIS, C. Controls of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi-preserved meat products. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, Iowa, v.35, n. 9, p. 514-523, 1972.
51. _____. Botulism food poisoning. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Canadian, v.6, p. 111-123, 1973.

52. ROBERTS, T.A., GIBSON, A.M. Chemical methods for controlling *Clostridium botulinum* in processed meats. **Food Technology**, Chicago, v.40, p. 163-176, 1986.
53. _____, SMART, J.L. The occurrence and growth of *Clostridium* spp in vacuum-packed bacon with particular reference to *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum*. **Journal of Food Technology**, United Kingdom, v.11, p. 229-244, 1976.
54. _____, _____. The occurrence of *Clostridium*, particularly *Clostridium botulinum* in bacon and pork. In: BARKER, A.N., WOLF, S., ELLAR, D.W. *et al.* **Spore Research**, 1976. New York, Academic Press, 1977. v.II, p. 911-915.
55. SAKAGUCHI, G. Botulism. In: RIEMANN, H., BREJAN, F.L. **Food Borne Infections and Intoxications**. 2.ed. New York: Academic Press, 1979, p. 389-442.
56. SARAIVA, D. *Clostridium botulinum* tipo C isolado de galinhas de Santa Maria (RS). IX **Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Belo Horizonte, MG. 23-27/07/1978.
57. SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., ÁVILA, F.A, BERCHIELLI, S.C.P. *et al.* Isolation and characterization of pathogenic *Clostridium* in commercialized meat products. **Ars Veterinaria**, Brasil, v.4, p. 91-98, 1988.
58. SERRANO, A.M. Botulism in Brazil. **Food Control**, Oxford, UK, v.1, p. 136-138, 1990.
59. _____, JUNQUEIRA, V.C.A. Crescimento de *Clostridium botulinum* em meios de cultura de *Clostridium perfringens*, em diferentes atmosferas anaeróbias e temperaturas de incubação. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 2, p. 131-135, 1991.
60. SMITH, L.D.S., HOBBS, G. Genus III. *Clostridium prazmowski* 1880, 23. In: BUCHANAN, GIABBONS, **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8. ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1974, p. 551-572.

61. _____, **Botulism: The organism, its toxins, the disease**. Springfield, IL, USA
Charles C. Thomas, 1977. 236p.
62. SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARE, M.E. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1986, v.2.
63. SOFOS, J.M., BUSTA, F.F., ALLEN, C.F. Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats. A review. **Journal of Food Protection**, Ames, Iowa, v.42, p. 739-770, 1979.
64. SONNABEND, O., SONNABEND, W. HEINZLE, R. *et al.* Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G toxin in human: report of five sudden unexpected death. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.143, p. 22-27, 1981.
65. SPERBER, W.H. Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. **Food Technology**, Chicago v.36, n. 2, p. 90-94, 1982.
66. SUEN, J.C., HATHEWAY, C.L., STEIGERWALT, A.G. *et al.* *Clostridium argentinense* sp nov: a genetically homogenous group composed of all strains of *Clostridium botulinum* toxin type and some nontoxigenic strains previously identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. **International Journal on Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, n. 4, p. 375-381, 1988.
67. SUGIYAMA, H. *Clostridium botulinum* neurotoxin **Microbiological Reviews**, Washington, v.44, n. 3, p. 419-448, 1980.
68. TACLINDO, C. Jr., MIDURA, T., NYGAARD, G.S. *et al.* Examination of prepared food in plastic packages for *Clostridium botulinum*. **Applied Microbiology**, Washington, v.15, p. 426-430, 1967.

69. THATCHER, F.S., ERDMAN, I.E., PONTEFRACT, R.D. Some laboratory and regulatory aspects of the control of *Clostridium botulinum*. in processed foods. In: INGRAM, M., ROBERTS, T.A. **Botulism, 1966**. London, Chapman and Hall Limited, 1967. p. 511-521.
70. TOMPKIN, R.B., CHRISTIANSEN, L.N., SHAPARIS, A.B. Variation in inhibition of *Clostridium botulinum* by nitrite in perishable canned comminuted cured meat. **Journal of Food Science**, v.42, p. 1046-1048, 1977.
71. WILLIAMS, S. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC)**. 14th ed., Arlington, VA, 1984. 1141p.
72. WOODS, L.F.J., WOOD, J.M. A note on the effect of nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. **Journal of Bacteriology**. v.52 (1), p. 109-110, 1982.