

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS "UNICAMP"
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PESQUISA DE *Clostridium botulinum*
E TESTE DE INOCULAÇÃO, EM PRODUTOS
CÁRNEOS EMBALADOS A VÁCUO

Trabalho de Conclusão de Curso

PROF. *Ruben Pablo Schocken-Iturrino*

Orientador: Dr. Fumio Yokoya

Tese de doutoramento, apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos
e Agrícola da Universidade Estadual
de Campinas, "UNICAMP".

Trabalho realizado no Departamento
de Microbiologia da Fa-
culdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias "Campus" de Jaboticaba
l - UNESP.

A

minha esposa

Dora Isabel,

e aos meus filhos

*Daniela Beatriz, Pablo Felipe e
Natalie Regina*

com amor

D
E
D
I
C
O

A

minha mãe e

aos meus irmãos

com eterna gratidão

O
F
E
R
E
Ç
O

Ao
meu pai

I
N

M
E
M
O
R
I
A
N

- À Deus, que Dele tudo recebo;
- Ao Prof.Dr. FUMIO YOKOYA, pela orientação, compreensão e amizade à nós dedicados;
- Aos Profs. e colegas IVALDO MELITO e ALVIMAR JOSÉ DA COSTA, pelo fornecimento dos inúmeros camundongos utilizados;
- Ao Prof.Dr. ANDRÉ TOSELLO, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola pelas facilidades proporcionadas para realização desta pesquisa;
- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus" de Jaboticabal, UNESP, pela oportunidade concedida;
- Ao amigo e colega Prof. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA, pelos conselhos e críticas construtivas;
- Aos Técnicos ANTONIO LUIZ SARTORI, ISALTINO ROCHA DA SILVA FILHO e GERALDO ALVES DE OLIVEIRA, pela seriedade e dedicação na realização deste trabalho;
- Aos Profs. TEREZINHA SALOMÃO e ARGEMIRO OLIVEIRA SOUZA, pela correção do texto;
- Aos amigos e colegas Dr.JOSÉ OCTÁVIO MACHADO, Prof.ELY NAHAS, Prof. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS e Profa. ANA ISABEL DE ASSIS pela amizade e compreensão nos momentos mais difíceis do presente trabalho;
- Ao Prof. Dr. FREDERICK C.STRONG III, pela grande colaboração prestada, enviando material bibliográfico do exterior;
- Aos Profs.Drs. ARAMIS AUGUSTO PINTO, e EDANIR DOS SANTOS, pela ajuda na discussão dos resultados, sugestões e o tempo a nós dedicados.
- Aos Profs. NELSON MOREIRA DE CARVALHO, NELSON GIMENEZ FERNANDES e KAZUIOSSE NAKAMURA da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus" de Jaboticabal, UNESP, pelo fornecimento de equipos para a realização deste trabalho;

- Ao Prof.Dr. PEDRO MAGALHÃES LACAVA, pelo estímulo nos momentos difíceis;
- À Srta. EDNA MARIA TESTA, pela dedicação nos serviços de dactilografia;
- Às Bibliotecárias desta Faculdade, pela correção na parte de Bibliografia;
- À Sra. ANTONIA BIBÓ ARLATI, pela valiosa colaboração na limpeza e ordem dos laboratórios e salas utilizadas;
- Finalmente estendo os reconhecimentos aos colegas, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização - deste trabalho.

I N D I C E

Página

- RESUMO.....	01
- SUMMARY.....	03
- INTRODUÇÃO.....	05
- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	08
1 - Histórico.....	08
2 - Características do organismo.....	14
2.1. Morfologia e características das colônias...	14
2.2. Características de cultivo.....	15
a - Temperatura.....	15
b - pH.....	17
c - Concentração de cloreto de sódio e atividade de água (aw).....	18
d - Atividade enzimática.....	20
e - Nitritos e nitratos.....	22
2.3. Habitat e frequência.....	26
3 - Características dos esporos.....	31
4 - Toxinas botulínicas e sua ação.....	34
5 - Isolamento.....	36
6 - Surto de botulismo.....	39
6.1. Botulismo no homem.....	39
6.2. Botulismo em animais.....	44
- MATERIAL E MÉTODOS.....	49
1 - Material.....	50
1.1. Culturas padrões.....	50
1.2. Meios de cultura.....	50
1.3. Amostras.....	52
1.4. Soluções e reagentes.....	52
1.5. Equipamentos e vidraria.....	53
1.6. Animais de laboratório.....	54

	Página
2 - Métodos.....	55
2.1. Coleta e preparo das amostras.....	55
2.2. Técnicas de enriquecimento.....	56
2.3. Preparo dos meios.....	56
2.4. Choques térmicos.....	57
2.5. Temperaturas e tempo de incubação.....	57
2.6. Constatação de crescimento.....	57
2.7. Teste de toxidez "in vivo".....	58
2.8. Teste de tripsinização.....	59
2.9. Teste controle.....	59
2.10. Teste de tipificação de toxinas.....	60
2.11. Isolamento de <i>Clostridium botulinum</i>	61
2.12. Teste para <i>Clostridium tetani</i>	62
2.13. Análise química das amostras destinadas a inoculação experimental.....	62
2.14. Inoculação experimental com <i>Clostridium bo</i> <i>tulinum</i>	63
- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
1 - Temperatura de armazenamento das amostras.....	66
2 - Constatação de crescimento de anaeróbios do gênero <i>Clostridium</i> nas amostras incubadas.....	70
3 - Teste de toxidez "in vivo" para demonstração de <i>C.</i> <i>botulinum</i>	73
4 - Teste de tripsinização.....	74
5 - Teste controle.....	74
6 - Teste de tipificação para toxinas botulínicas.....	77
7 - Isolamento de <i>Clostridium botulinum</i>	77
8 - Teste para <i>Clostridium tetani</i>	83
9 - Análise química de amostras de presunto, salsicha e "bacon".....	84
10 - Inoculação experimental de <i>Clostridium botulinum</i> em amostras de presunto, salsicha, "bacon" e cora ção de boi.....	89
- CONCLUSÕES.....	95
- CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS.....	98

RESUMO

RESUMO

O presente trabalho teve por finalidade detectar a presença de *Clostridium botulinum* em produtos cárneos embalados a vácuo e testar mediante inoculação experimental se os produtos analisados permitiriam ou não o desenvolvimento de *C. botulinum* e a produção de sua toxina.

Os testes empregados demonstraram a ausência de *C. botulinum*, porém foi detectada a presença de *Clostridium tetani* em dezessete amostras. Na inoculação experimental os resultados demonstraram que o *C. botulinum* cresceu em quase todas as amostras armazenadas a temperaturas acima de 3°C. Também foi demonstrado que os teores de cloreto de sódio, nitrito e nitrato determinados nas amostras, não inibem a germinação de esporos de *Clostridium botulinum* e sim as baixas temperaturas.

SUMMARY

SUMMARY

The present work has as its objective the detection of *Clostridium botulinum* in vacuum-packed meat products and to test experimentally if these kinds of products will support or not the development of *C. botulinum* and the production of its toxins. The tests used, showed the absence of *C. botulinum*, however the presence of *Clostridium tetani* was detected in seventeen samples.

In the experimental inoculation the results demonstrated that *C. botulinum* grew in almost all the samples stored at temperatures above 3°C. Also, it was proved that the concentrations of sodium chloride, nitrite and nitrate detected in the samples, was not sufficient to inhibit the germination of *Clostridium botulinum* spores. Rather, this was accomplished by the storage at low temperatures.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma toxinfecção alimentar causada pelo *Clostridium botulinum*, cuja presença tem sido assinalada praticamente em quase todos os países do globo terrestre (DOLMAN, 1964).

Existem 7 tipos diferentes de toxinas, já isoladas e identificadas (A, B, C, D, E, F, G), produzidas por diferentes amostras de *Clostridium botulinum*, patogênicas para o homem e animais.

A ocorrência de botulismo e o tipo de toxina prevalente varia de país para país e se deve principalmente aos hábitos alimentares (HUANG, 1969).

Os trabalhos sobre isolamento de *Clostridium botulinum* realizados na América do Sul são poucos, entretanto, já fo

ram registrados casos na Venezuela, Colombia e Argentina. No Brasil, já foram isolados, no Ceará, de sedimentos marinhos, os tipos A, B, C e F; no Piauí, os tipos C e D, isolados de bovinos e no Rio Grande do Sul, o tipo A, isolado de peixe enlatado e o tipo C isolado de galinhas intoxicadas pelo consumo de ração contaminada.

Pelos trabalhos existentes, na vasta literatura consultada, pode-se verificar que a grande maioria dos casos de botulismo se deve ao consumo de carnes semi-preservadas, como "bacon", presuntos e outros (ABRAHAMSSON & RIEMANN, 1971), bem como em produtos embalados a vácuo (ROBERTS & SMART, 1976).

Por essas razões, os objetivos do presente trabalho foram:

- 1 - detectar a presença de *Clostridium botulinum* em produtos cárneos embalados a vácuo (salsicha, presunto e "bacon");

- 2 - verificar a viabilidade de esporos de *Clostridium botulinum* inoculados experimentalmente em produtos cárneos, armazenados em diferentes temperaturas e com concentrações de sal, nitrato e nitrito previamente determinadas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 - Histórico

Botulismo é uma doença causada pela ingestão de um alimento que pode estar aparentemente inócuo, sem alteração, nem decomposição, mas no qual houve condições para que o *Clostridium botulinum* se multiplicasse e produzisse uma substância neurológica, na maioria das vezes mortal, chamada de toxina botulínica.

O termo botulismo deriva de "*botulus*", em latim, salicicha, também denominada de allantiasis, do grego "*allanton*" com o mesmo significado.

A história não tem registro sobre casos de botulismo anteriores a 1793, ainda que se atribua a uma intoxicação bo

tulínica a atitude do Imperador da Bizantina, Leo VI, o qual, no século X (886-911), proibiu a elaboração de salsichas e chouriços (MEYER, 1928). Foi na Alemanha, em Wildbad, Wurttemberg, em 1793, que aconteceu o primeiro surto, com intoxicação de 30 pessoas, das quais morreram 6, pelo consumo de "Blunsen", que é um tipo de salsicha fervida e defumada, feita com carne, sangue de porco e outros ingredientes (DICKSON, 1918). O número de casos por envenenamento com salsichas aumentou rapidamente nas décadas seguintes, justificando um estudo adequado destas intoxicações por JUSTINUS KERNER (1820, 1822) que verificou 230 casos de botulismo. Enquanto que os casos com sintomas neuromusculares de botulismo eram, na Alemanha, associados ao veneno das salsichas, na Rússia o era em peixes, sendo denominado "*ichthysm*". Em 1818, foram reportados 7 casos fatais com a doença neuromuscularizante, devido ao consumo de peixes salgados (MATVEEV, 1959).

Muitas teorias sobre a origem da substância foram conjecturadas com o tempo. O botulismo foi reconhecido como um quadro clínico, em muitos países, nos séculos XVIII e XIX, e foi claramente associado com o consumo de certos alimentos. Mais tarde, o método da preparação destes é que foi apontado como o principal fator (salsichas defumadas ou cozidas). A causa precisa de botulismo não foi conhecida até 1895, quando ocorreu um surto de intoxicação, com sintomas de neuromuscularização, em um grupo de músicos que haviam ido ao funeral de um colega em Ellezelles, na Bélgica; depois das cerimônias, eles consumiram um presunto salgado, o qual causou a morte de 3 deles e

intoxicação de outros 20. Examinando os restos do presunto, van ERMENGEM verificou que o extrato deste era tóxico para animais de Laboratório, produzindo a mesma doença paralizante que havia acometido aos pacientes, e assemelhava-se muito ao botulismo no homem. Tanto do presunto como do baço de um dos homens que morreu, ele isolou um bacilo anaeróbio estrito, formador de esporos, que considerou como o mesmo responsável pela doença chamada de "veneno das salsichas", denominando-o *Bacillus botulinus*.

Van ERMENGEM demonstrou também que esse microrganismo crescia bem, em laboratório, à temperatura de 25-30°C, produzia uma toxina desnaturável pelo calor, inativada pela fervura durante 5 minutos, ou 30 minutos, a temperatura de 80°C, e resistia ao tratamento com álcool, enzimas proteolíticas e ácidos fracos. Camundongos, macacos, cobaias e coelhos morriam com pequenas quantidades dessa toxina, quando administradas por via oral ou parenteral. Frangos e cachorros eram resistentes.

Com isto desvendou todos os fatores essenciais a restei-ro do botulismo:

- não é uma infecção e sim intoxicação;
- a toxina é produzida nos alimentos por uma bactéria específica;
- é ingerida com o alimento e não inativada pelo processo digestivo;
- é relativamente resistente a agentes químicos;
- é inativada pelo calor;
- não se produz em alimentos com alto teor de sal;
- nem todas as espécies animais são suscetíveis (van ERMENGEM, 1896, 1897).

No início pensou-se que o botulismo só estivesse ligado a carnes e peixes, porém mais tarde, em Darmstadt, Alemanha, 11 pessoas morreram depois da ingestão de salada feita com feijão enlatado. O resto dos feijões foi analisado por LANDMANN (1904), que isolou um bacilo similar ao bacilo isolado por van ERMENGEM e produtor de toxina com as mesmas características. LEUCHS (1910) comparou o bacilo isolado por van ERMENGEM com o isolado por LANDMANN (1904), constatando que os dois microrganismos produziam toxinas com o mesmo efeito e sintomas, ainda que as características culturais fossem diferentes e que a antitoxina preparada contra uma não neutralizasse a outra, indicando toxinas sorologicamente diferentes e a existência, portanto, de mais de um tipo de *Bacillus botulinus*, designados de tipo A e B.

Seguiu-se uma série de surtos, nos Estados Unidos da América, devido ao consumo de frutas e vegetais, entre os quais muitos produtos comercialmente enlatados. MEYER & EDDIE (1950) registraram durante o período 1918-1922, 83 surtos, principalmente na Califórnia, com 297 pessoas afetadas, das quais 185 morreram. O grande número de casos durante a 1^a Guerra Mundial deveu-se ao aumento das conservas caseiras, onde a temperatura não consegue destruir os esporos dos tipos de *Clostridium botulinum* mais resistentes. Quando esporos deste microrganismo, especialmente os do tipo A, germinam e crescem em vegetais não ácidos como feijão, ervilha ou beterrabas, não há sinais de al

ção, embora suficiente quantidade de toxina possa ser produzida, transformando-se em um produto altamente letal (DICKSON , 1917; SMITH, 1977).

O resultado desses surtos foi um extenso programa de pesquisa para prevenir o botulismo de alimentos enlatados. Esses trabalhos determinaram a adoção de "processos térmicos mínimos de segurança", para aumentar a probabilidade de que esporos de *Clostridium botulinum* não sobrevivessem. A partir daí os casos de botulismo por alimentos enlatados comerciais foram muito raros (MEYER, 1956; DOLMAN, 1964).

O *Clostridium botulinum* tipo C foi descoberto na Austrália, por SEDDON (1922 a, b), quando descobriu que a doença em gado, chamada de *paralisia bulbar*, era uma intoxicação pelo consumo de restos de carne que teriam sido contaminados com o organismo que ele chamou de *Bacillus para botulinus*. Nos Estados Unidos, BENGSTON (1922) isolou *Clostridium botulinum* tipo C da larva de *Lucília caesar*, envolvida em doença de paralisia em frangos.

O tipo D foi isolado da carcaça de uma vaca morta por *lamsiekte*, doença esta paralisante, responsável pela morte de muitas reses, anualmente, na África do Sul (MEYER & GUNNISON, 1928).

Um surto de intoxicação, provocada pelo consumo de peixe, permitiu a descoberta do *C.botulinum* tipo E, que produziu um tipo de toxina não neutralizada pelas antitoxinas conhe-

cidas. Paralelamente, HANZEN (1937) isolou um microrganismo capaz de produzir uma toxina similar, em uma lata de peixe (*Clupea sprattus*) processada na Alemanha.

O tipo F detectado por MOLLER & SCHEIBEL, só em 1960, de um patê de fígado feito em casa, em Langeland, Dinamarca, responsável pela morte de uma pessoa.

O último tipo de *Clostridium botulinum* reconhecido é o G, descrito por GIMENEZ & CICARELLI (1970), isolado do solo, em Mendoza, Argentina.

2 - Características do organismo

2.1. Morfologia e características das colônias

O *Clostridium botulinum* engloba um grupo de microrganismos (7) em forma de bastonetes retos, com extremos arredondados, medindo de 0,5-2 μ m de largura por 2 a 10 μ m de comprimento, anaeróbios móveis, com flagelos peritríquios. Produzem esporos ovais sub-terminais. São positivos para a reação de Gram, podendo ser também Gram negativos depois da esporulação (PREVOT, 1966; BUCHAMAN & GIBBONS, 1974). Com base nas reações sorológicas específicas das toxinas, foram determinados 7 tipos de *Clostridium botulinum*, mas todas as toxinas apresentam um efeito farmacológico similar (BOROFF & DASGUPTA, 1971; SMITH, 1977).

As colônias de *Clostridium botulinum* dos tipos A, B e F apresentam 3 a 8 mm de diâmetro, com o centro normalmente

ressaltado e cor levemente amarelada (creme); são opacas, com margens irregulares em forma rizóide, sendo muito similares às colônias de *Clostridium sporogenes*, caracterizadas pelo nome de cabeça de medusa. Entretanto, também existem colônias de *C. botulinum* lisas e com bordas de forma levemente rizóide (SMITH, 1977). Colônias irregulares, transparentes, hemolíticas em agar-sangue foram descritas para os tipos A e B, e menores e não proteolíticas para os tipos C e D (PREVOT, 1966).

Os *C. botulinum* não proteolíticos tipos C e D apresentam colônias circulares, ligeiramente irregulares, elevadas no centro, translúcidas, cor cinza esbranquiçado, com uma superfície suave e de bordas ligeiramente irregulares (SMITH, 1977).

As colônias de *Clostridium botulinum* tipo G, são menores que as das outras espécies (0,5 a 1,5 mm diâmetro), elevadas, translúcidas, cor cinza, superfície lisa e brilhante e margens inteiras (CICARRELLI & GIMINEZ, 1972).

2.2. Características de cultivo

a - Temperatura

Todas as espécies são mesófilas, mas os intervalos de temperatura variam com a espécie. *Clostridium botulinum* tipos B - E - F podem crescer a temperaturas tão baixas quanto 3°C (ROBERTS & HOBBS, 1968). INSALATA et alii (1967) não obtiveram crescimento a partir de esporos do tipo E a 10°C, durante 5 semanas, mas SCHMIDT et alii (1961) demonstraram crescimento e pro

dução de toxinas de *C. botulinum* do tipo E a 4,4°C e a 3,3°C. Também crescimento a 6,1 e 9,4°C foi demonstrado por SCHMIDT et alii (1961b). *C. botulinum* tipo C cresce a 12°C (SEGNER et alii, 1971a). A temperatura ótima de crescimento para o *Clostridium botulinum* tipo E é ao redor de 30°C, e para os tipos B e F em torno de 37°C, mas todas elas crescem e produzem toxina à temperatura de 3,3°C (SMITH, 1977). Para o *C. botulinum* tipo C a faixa de temperatura ótima de crescimento é um pouco maior, de 25 a 37°C. Os mais sensíveis a baixas temperaturas são os tipos C, de origem marinha (SEGNER et alii, 1971b), não crescendo a temperaturas inferiores a 15°C.

SUGIYAMA (1951) obteve crescimento de *Clostridium botulinum* tipos A e B, com formação de esporos, a 24, 29 e 41°C. Os esporos de *Clostridium botulinum* tipo A germinam em uma faixa de temperatura que vai de 4 a 70°C (ROWLEY & FEEHERRY, 1970).

Em 1957, OHYE & SCOTT reportaram que *Clostridium botulinum* tipo E podia crescer bem, a temperaturas abaixo de 10°C. De 9 espécies, 6 produziram toxinas a partir de um inóculo com esporos incubados a 5°C, durante 3-4 semanas, ainda que nenhuma crescesse e produzisse toxina a 2,5°C, durante 22 semanas. Essas observações foram confirmadas e ampliadas por DOLMAN et alii (1950), mas um sub-tipo do tipo E cresceu em arenque macerado a 6°C. SCHMIDT et alii (1961b) informaram a produção de toxina, a partir de um inóculo de células vegetativas em carne de boi cozida, depois de 31-45 dias a 3,3°C, mas não a 2,2°C, depois de 104 dias.

ABRAHAMSSON et alii (1966) relataram a produção de toxina, tanto em carnes quanto em peixe, a 3°C, depois de 3 meses, usando um inóculo de uma mistura de esporos e células vegetativas, mas não observaram toxina quando foram inoculados só esporos. Não houve produção de toxina com qualquer um dos inóculos, quando armazenados durante 1 ano, a 1°C.

EKLUND et alii (1967) observaram que as espécies não proteolíticas raramente deixam de crescer e produzir toxina a 3,3°C. Isto foi confirmado por ROBERTS & HOBBS (1968), os quais reportaram que um dos tipos B não proteolíticos cresceu a 5°C, depois de 40 dias. Também informaram o crescimento de *Clostridium botulinum* tipo F proteolítico, a 5°C. WALLS (1967) demonstrou o crescimento e produção de toxina de *Clostridium botulinum* tipo F "Langeland" a 4°C.

B - pH

O crescimento ocorre em uma faixa ampla de pH, sendo o ótimo de 6,8 a 7,0. Os tipos proteolíticos não crescem em pH inferior a 4,5, ainda que o mínimo para tipos não proteolíticos seja um pouco superior, ao redor de 5,0-5,2. O pH máximo permitido para crescimento está em cerca de 8,5. Embora ocorra crescimento acima deste pH, a toxina é somente estável em pH ácidos e torna-se instável em pH acima de 7,0 (HOBBS, 1976).

DOZIER (1924) relatou um pH limite de 4,87, abaixo do qual o crescimento de *Clostridium botulinum* não ocorre para um inóculo de células vegetativas, e um pH de 5,01, para um inó

culo de esporos.

SCHOENHOLTZ et alii (1923) inocularam esporos de *C. botulinum* em vegetais enlatados, com valores de pH de 4,45, observando a formação de toxina que, entretanto, nunca apareceu em produtos com pH abaixo de 4,0. Surtos de botulismo com alimentos ácidos enlatados, cujos pH estavam abaixo de 5,4, foram relatados por MEYER & GUNNISON (1929) e por SLOCUM et alii (1941).

INGRAM & HANDFORD (1957) indicaram que não há crescimento de *C. botulinum* a pH 4,5 em pão, mas que este deve ser prevenido em pH 4,8. Entretanto, TOWNSEND et alii (1954) acidificaram alguns alimentos com ácido cítrico, verificando o mais baixo pH que permitiu a germinação de esporos de *C. botulinum* e a produção de toxina foi 4,8.

ROWLEY & FEEHERRY (1970) informaram germinação de esporos de *C. botulinum* tipo A em faixas de pH 5,0 a 9,0 com um ótimo de 6,1 a 7,0.

C - Concentração de cloreto de sódio e atividade de água (a.w.).

Os *C. botulinum* tipos A e B são relativamente resistentes ao efeito inibidor do sal, crescendo até uma concentração - limite de 8 a 10%, o que equivale a uma atividade de água (aw) de 0,95-0,94. O tipo E é mais sensível ao efeito inibidor do sal e pode-se evitar o seu crescimento com concentrações de 4 a 5%, equivalentes a uma atividade de água de 0,98-0,97 (GREENBERG et alii (1959). EMODI & LECHOWICH (1969) determinaram que o cres-

cimento do tipo C é inibido por 5% de cloreto de sódio, a_w 0,975; por 6% de cloreto de potássio, a_w 0,974; 5,5% de fosfato de sódio, a_w 0,971; 38,5% sucrose com a_w 0,976 e 22,5% glicose com a_w 0,090.

SCOTT (1955) achou que o *Clostridium botulinum* tipo B pode crescer em uma solução de sacarose 50%, com a_w 0,935, mas não em concentrações de 55%, a_w 0,917. OHYE & CHRISTIAN (1967) investigaram o efeito do a_w em *C. botulinum* tipos A e B, a várias temperaturas e valores de pH, usando sais para ajustar a a_w . As temperaturas ótimas (30-40°C) e com valores de pH 7,0, as mínimas a_w que permitiam crescimento eram 0,95 para o tipo A e 0,94 para o tipo B, concordando com o trabalho de GREENBERG et alii (1959). Reduzindo a temperatura para 20°C, a mínima a_w que permitiu crescimento foi 0,97 para os dois tipos. BAIRD-PARKER & FREAME (1967) reportaram que a temperaturas e pH ótimos, *Clostridium botulinum* tipos A e B podem crescer até uma a_w de 0,96, quando se usa cloreto de sódio para controlar, mas pode chegar a a_w 0,93, quando se utiliza glicerol.

A respeito de *Clostridium botulinum* tipo E, ABRAHAMSON et alii (1966); SEGNER et alii (1966); OHYE et alii (1967); BAIRD-PARKER & FREAM (1967) concordam que, nas condições ótimas de temperatura e pH, ele é inibido por concentrações de 4 a 6% de cloreto de sódio ou uma a_w de 0,965 a 0,97, ainda que o último pesquisador referisse crescimento em a_w 0,94, quando se faz uso de glicerol como controlador de a_w .

d - Atividade enzimática

Os tipos de *Clostridium botulinum* eram divididos em 2 grupos: proteolíticos e não proteolíticos, dependendo da sua habilidade para hidrolizar proteínas tais como: caseína, albúmen de ovo coagulado ou soro coagulado. Às vezes eram denomininados também de "ovolíticos", pela digestão de albúmen de ovo. Outros denominavam de "parabotulinum" os tipos proteolíticos.

Tudo isso é inadequado, já que a denominação de "parabotulinum" foi originalmente utilizada para tipos não proteolíticos de *Clostridium botulinum* do tipo C, por SEDDON (1922a). Ainda mais, há muitas variações na atividade proteolíticas entre tipo e sub-tipo. *Clostridium botulinum* com toxinas tipo B ou F podem ser proteolíticas ou não proteolíticas e existem ainda tipos C e D levemente proteolíticos. Assim sendo, o sub-comimitê de *Clostridium*, no VI Congresso Internacional de Microbiologia, recomendou a denominação de "botulinum", para todos os microrganismos produtores de neurotoxina botulínica (HOBBS, 1976; SMITH, 1977).

Existe hoje uma divisão em grupos, baseados em características sorológicas e culturais, as quais são enfatizadas pelos valores de homologia do DNA e RNA (LEE & RIEMANN, 1970; JOHNSON & FRANCIS, 1975). Essa divisão é:

- GRUPO I : *Clostridium botulinum* tipo A ovolíticos e tipos B e F (proteolíticos).
- GRUPO II: *Clostridium botulinum* tipos B e F proteolíticos e

todos os tipos E.

- GRUPO III: *Clostridium botulinum* tipos C alfa e beta e tipo D.
- GRUPO IV: *Clostridium botulinum* tipo G proteolítico.

Grupo I fermenta glicose e frutose, sendo variável para maltose, salicina e sucrose. A produção de ácido é mascarada pela amônia produzida na degradação de aminoácidos. Não fermentam adonitol, amigdalina, arabinose, celobiose, celulose, dulcitol, esculina, galactose, glicerol, glicogênio, inositol, inulina, lactose, manitol, manose, melobiose, rafinose, ribose, sorbitol, amido, trialose e xilose. A maioria dos aminoácidos são desanimados, com exceção da tirosina e fenilalanina. Produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S), não produzem indol nem urease (LANDGREBE & WEAVER, 1966). Reação da lipase é produzida em agar gema de ovo, e produtos da fermentação incluem ácidos acético, butírico, propiônico, isobutírico, isovalérico, propil, isobutil, butil e álcool isoamílico.

Os tipos do Grupo II fermentam frutose, glicose, manose e sucrose, são variáveis na fermentação de amigdalina, arabinose, galactose, maltose, ribose e sorbitol. Não fermentam adonitol, celobiose, celulose, dulcitol, esculina, glicerol, glicogênio, inositol, inulina, lactose, manitol, melobiose, rafinose, ramnose, salicina, sorbose, trialose e xilose. A maioria hidrolisa gelatina; o leite é coagulado, mas não digerido; há hemólise em agar sangue e lipase, mas não lecitinase em agar gema de ovo. Há alguns tipos que são ligeiramente proteolíticos. Não produzem sulfeto de hidrogênio, urease nem indol. Não re-

duzem nitratos e nitritos. O maior produto de fermentação é composto de ácidos acéticos e butírico (BUCHAMAN et alii, 1974; Smith, 1977).

Os organismos do Grupo III, tipos C, alfa e beta, e tipo D não proteolíticos fermentam glicose, frutose, maltose, manose, ribose. Alguns tipos não fermentam frutose nem maltose. Existe grande variação na fermentação de ribose, adonitol, arabinose, galactose, triose, piruvato e amido. Não fermentam o resto dos carboidratos anteriormente citados. Não fermentam aminoácidos. Na fermentação, produzem ácidos acético, propiônico e butírico. Este grupo reduz lactatos a propionatos, especialmente em carne (ANDO & KARASCHIMODA, 1970; HOBBS, 1976).

O Grupo IV, *Clostridium botulinum* tipo G, não fermenta os substratos mais comuns, como adonitol, arabinose, celobiose, dulcitol, fructose, galactose, glicogênio; lactose, maltose, amido, etc. Fermenta substratos como a lisina, histidina, citrato, oxalo-acetato e piruvato. Na fermentação, produz ácidos acético, butírico, isobutírico, isovalérico, láctico, alcoóis propílico e butílico. Hidrolisa gelatina e caseína. Produz sulfeto de hidrogênio. Não produz indol, urease, lecitinase nem lipase (CICCARELLI & GIMENEZ 1972).

e - Nitrato e Nitrito

O uso de nitratos na cura de carnes é uma prática antiga, porém sua atuação só foi compreendida neste século, quando HALDANE (1901) e HOAGLAND (1914) explicaram seu efeito na

produção de uma cor vermelha estável nas carnes curadas, na base de uma redução microbiológica do nitrato a nitrito e da combinação do nitrito com os pigmentos heme da carne. Se os nitratos possuem efeito antimicrobiano, é matéria de estudos e conjecturas até hoje.

JENSEN (1954) comentou: "no campo da microbiologia de carnes há poucos assuntos sobre os quais existe mais controvérsia de que no efeito de nitrato de sódio sobre as bactérias anaeróbias em carnes". A grande maioria das evidências obtidas durante os últimos 50 anos indica que não possui outro efeito a não ser abaixar a atividade da água (aw) (GRINDLEY, 1929; YESAIR & CAMERON, 1942; MUNDT & KITCHEN, 1951; GOUGH & ALFORD, 1965).

MOULTON (1930) e MOULTON & LEWIS (1940) apresentaram dados sobre o efeito do nitrato em alguns tipos de *Clostridium* na presença ou ausência de outros sais de curado, e concluíram que o nitrato sozinho, em uma concentração de 0,9%, possui um efeito inibitório. GROSS et alii (1946) se contrapõem as afirmações de MOULTON (1930) e MOULTON & LEWIS (1940).

JANSEN & HESS (1941) também reportam que nitratos possuem um certo poder inibidor sobre anaeróbios putrefativos, porém ANDERTON (1963) não concorda com estas afirmações.

GRINDLEY (1929) encontrou marcada inibição bacteriana pela ação do nitrato de sódio em pH baixos e descreve que isto se deve à formação de ácido nitroso. Na presença de calor, possui também efeito inibidor sobre esporos de *Clostridium* (RIE MANN, 1963).

Em concentrações altas o efeito inibidor é indiscutível; 6,6% inibe o crescimento de inúmeros *Clostridium*, incluindo *Clostridium botulinum* (TANNER & EVANS, 1933), mas em concentrações menores do que 0,5% não há efeito inibitório, mesmo na presença de 3,5% de cloreto de sódio.

TARR (1941, 1942) demonstrou que a concentração de 200 p.p.m. de nitrito, a pH 5,6, não era capaz de inibir *Clostridium botulinum*, o que foi confirmado por STEINKE & FOSTER (1951), trabalhando em pH 6,1 e 6,5.

ABRAHAMSSON (1964) reportou que o crescimento de *Clostridium botulinum* tipo E, a pH 7,2 e 30°C, foi parcialmente inibido com 170 p.p.m. de nitrito e totalmente inibido por concentração de 340 p.p.m.

SCHMIDT (1964) verificou que a pH 7,0 e 8°C, 200 p.p.m. de nitrito não inibiram o crescimento de *Clostridium botulinum* tipo E. Entretanto, PIVNICK et alii (1967) relatam que, em produtos embalados a vácuo e a 20°C, 450 p.p.m. de nitrito foram insuficientes para inibir *C. botulinum* tipos A e B, na presença de 4% de cloreto de sódio. PERIGO et alii (1967) relacionaram pH e concentrações de nitrito, verificando que concentrações de 300 p.p.m., 150 p.p.m. e ao redor 50 p.p.m., respectivamente em pH 7,0; 6,5 e 6,0 evitam crescimento de *Clostridium sporogenes*.

CHRISTIANSEN et alii (1975) demonstraram que o efeito inibitório de nitrito no crescimento de *C. botulinum*, em salsichas, está diretamente ligado ao pH. Usando somente 50 µg

de nitrito, por grama de carne, houve inibição nas 175 amostras formuladas com dextrose, nas quais o pH abaixou para 4,68 - 4,38 durante o armazenamento a 27°C; entretanto, nas amostras sem dextrose, onde o pH permaneceu inalterado (5,8-5,2), níveis de 150 µg/g não evitaram o crescimento de *C.botulinum*. TOMPKIN et alii (1979) fizeram uma relação entre o teor de ferro das carnes e o efeito antibotulínico do nitrito. Demonstraram que o grau de inibição de *Clostridium botulinum* pelo nitrito é inversamente proporcional à relação de ferro existente. Em produtos feitos com carne de porco fresca, contendo ferro entre 9 a 12 µg/g, ou corações, contendo entre 38 a 48 µg/g, não houve inibição, com concentrações de NO₂ de 156 e 200 µg/g de carne.

COLLINS-THOMPSON et alii (1974) demonstraram que as perdas de nitrito depois do processamento são da ordem de 1/3 dos níveis originais e a formação de toxina botulínica depende da temperatura e não do nitrito. Em um experimento com 156 pacotes de "bacon", com teores de 0 a 200 p.p.m. de NaNO₂, inoculados com 10² esporos/g e armazenados a 20°C, nenhum apresentou toxidez, depois de 32 dias. Contudo em outro experimento, em condições similares, mas com 104 esporos/g, 1 pacote com 100 p.p.m. e outro com 200 p.p.m. de nitrito ficaram tóxicos, porém amostras-controle, com zero de nitrito, não ficaram tóxicas e quando incubadas a 30°C, a incidência de produtos tóxicos aumentou. O mesmo foi evidenciado por CHRISTIANSEN et alii (1974).

TOMPKIN et alii (1978) entenderam que uma boa hipótese de ação inibitória de nitrito, sobre *Clostridium botuli-*

num, seria uma reação de óxido nítrico formado com o ferro de algum composto, como a ferredoxina, dentro da célula germinante. Esta reação poderia interferir no metabolismo energético, evitando o seu crescimento.

2.3. Habitat e frequência

Clostridium botulinum é um microrganismo mundialmente disseminado; ele tem sido isolado em amostras de solo de todos os continentes e em sedimentos e conteúdo intestinal de pássaros e mamíferos. A maior ocorrência é no solo, a partir do qual chega a contaminar alimentos, por possuir esporos altamente resistentes, tanto ao calor quanto à dessecação.

Nos Estados Unidos, *Clostridium botulinum* tipo E é comum na Bahia Verde do Lago Michigan. O tipo A apresenta-se nos solos das montanhas rochosas, perto do Oceano Pacífico. No solo oeste, os tipos mais frequentes são A, B e C (MEYER & DUBOVSKI, 1922a, 1922b).

Do lado atlântico do E.E.U.U. há uma alta incidência de *Clostridium botulinum*. Foi demonstrado em 76% das amostras de solo em Maryland, predominando os tipos A, B e C (DAMON & BAYABAL, 1926). O tipo F tem sido demonstrado, de preferência, em amostras de lama de pântano, em Dakota do Norte, por WENTZ et alii (1967). Também foi isolado de vegetais estragados; isto aconteceu na Califórnia, onde a ingestão destes ocasionou um surto, mas o organismo não pode ser isolado das fezes. EASTON &

MEYER (1924) isolaram esporos de *Clostridium botulinum* tipos A e B em 8,5% das fezes dos animais analisados.

Na região norte das costas do Pacífico, *Clostridium botulinum* é aparentemente, muito comum para EKLUND & POYSKY (1970), os quais isolaram os tipos A e E, em sedimentos do Rio Colúmbia.

SMITH (1975) isolou *Clostridium botulinum* tipos A e B em 7 de 40 amostras de solo do oeste do Rio Missouri.

BOTT et alii (1968) e SUGIYAMA et alii (1970) entendem que esse microrganismo se encontra, de preferência, em sedimentos profundos, mais do que na superfície e, nas amostras do litoral, acha-se nas ribeiras e não nas praias. GRAIKOSKI et alii (1970) demonstraram que a frequência de *Clostridium botulinum* em plancton e em sedimentos profundos é bem maior do que nos invertebrados na água.

PACE et alii (1967) demonstraram que 13 a 14% dos peixes frescos eviscerados, do lago Michigan, têm *Clostridium botulinum* tipo E.

Solos com cultivo de feijão têm alta porcentagem de *C. botulinum*, em relação a outras culturas (PARRY, 1956). O tipo E tem sido demonstrado em água e em operlano (*Omerus morax*) e em "black bass" (*Micropterus dolomieu*) em New York (CHAPMAN & NAYLOR, 1966).

No Canadá, a presença de *C. botulinum* está relacionada a peixes e a amostras de solo, sendo que os tipos A, B e E foram isolados dos solos de Nova Escócia, Quebec, Ontário e ou-

tras cidades. O tipo E, em peixes do Lago Martin, em Manitoba (DOLMAN, 1961).

Na América do Sul, *Clostridium botulinum* tipos F e G foram encontrados na Argentina, em amostra de solo, (GIMENEZ & CICARELLI, 1968, 1970).

WARD et alii (1967a) demonstraram *Clostridium botulinum* no golfo do México; de 1414 amostras, 3 apresentaram *C. botulinum* tipo A; 3, tipo B; 9, tipo C; 6, tipo D; 36, tipo E e 1 tipo F.

Na Venezuela foram achados os tipos A, B, C e E, em camarão (*Panaeus asterus*) e em intestinos de peixes, no golfo de Darien (CARROLL et alii, 1966).

No Brasil, foram isolados, no Ceará, os tipos A, B, C e F, em sedimentos marinhos, (WARD et alii, 1967b). No Piauí, TOKARNIA et alii (1970) isolaram os tipos C e D de bovinos. JEFFMAN (1960) informou a presença de *C. botulinum* tipo A em peixe enlatado.

Na Nicaraguá e em Honduras, foram demonstrados os tipos A, B, C e F, em amostras de água, sedimentos e peixes (WARD et alii, 1967b).

No Alaska há notícias da presença de *C. botulinum* principalmente dos tipos A, B e E em água e nas guelrras de peixe (HOUGHTBY & KAYSNER, 1969). Foram isolados também em peixes desta região, *C. botulinum* do tipo F (CRAIG & PILCHER, 1966).

Na Inglaterra, os tipos mais comuns são o A e o B. HAINES (1942) encontrou 37 amostras de solo positivas em 106 amostras examinadas. Nas amostras de águas costeiras, a frequência do tipo B foi de 3,5% (CANN et alii, 1968).

Na Península Escandinava, FAHARAEUS (1949) demons

trou a presença dos tipos A e B, em 4,5% das amostras do solo submetidas a análise. Nas costas da Dinamarca, PEDERSEN (1955) demonstrou o tipo E em sedimentos e em peixes. Em uma investigação de 650 amostras foram encontrados, além do tipo E, o tipo B em 4 amostras e o tipo C em 1 delas; o tipo A não foi detectado, enquanto que o tipo E foi demonstrado em 388 amostras.

Na Noruega, NIELSEN & PEDERSEN (1967) demonstraram os tipos B e E.

Na Alemanha, WENTZELL et alii (1971) e BAUMGART (1972) isolaram *C.botulinum* tipo E em amostras de lama e em truta.

Na França, o tipo E foi isolado de peixe, (*Perca fluviatilis*) perto de Paris (PREVOT & HUVET, 1951).

Na Rússia, um extenso trabalho foi realizado por KRAVCHENKO & SHISHULINA (1967), que examinaram mais de 4.200 amostras na pesquisa de *Clostridium botulinum* e *Clostridium tetani*, com os seguintes resultados:

Clostridium botulinum tipo A em 37 amostras; tipo B, em 125 amostras, tipo C, em 9 amostras; tipo D, em 1 amostra; tipo E; em 277 amostras e *Clostridium tetani*, em 787 amostras. O tipo F foi demonstrado por BULATOVA et alii (1973), depois da análise de 1949 amostras de solo, sedimento, intestinos de peixe e fezes de veados. Segundo esses autores, 6 amostras pertenciam ao tipo A, 20 ao B, e 2 ao C, 10 aos tipos A e C, 27 ao tipo E e 67 ao tipo F.

No Japão, a maior frequência é de *Clostridium botulinum* tipo E. KANAZAWA et alii (1970) acharam em Hobbaído, o tipo E em 13,1% de 900 amostras, tomadas ao largo das costas e

em 18,8% de 900 amostras coletadas de rios e lagos. KODAMA (1970) investigou 6.883 amostras de solo da zona costeira, rios e lagos, na região de Akita, isolando o tipo E de 20 amostras e o tipo A, de 4. Na mesma região (YAMAMOTO et alii, 1970), estudando 110 peixes isolaram 3 amostras de *C.botulinum* do tipo E e 2 do tipo F.

Na Austrália, foi isolado o tipo A, e o D, especialmente em solos virgens montanhosos, o tipo B em silagem e carne de coelho, mas não no solo (EALES & TURNER, 1952).

Na África, nas regiões sul e sudoeste, a presença do *Clostridium botulinum* tipo B foi detectada em 3% das amostras de solo (KNOCK, 1952). O tipo D está presente no sul da África, onde causa consideráveis terras de gado. A análise da lama dos lagos do Parque "Zululand Game Parks" revelou uma ocorrência de 2,5% (MASON, 1968). SCHEUBER (1929) não conseguiu isolar *C.botulinum* de 100 amostras de solo, mas demonstrou o tipo D, no trato digestivo de gado sadio ou com "lamsekte" (botulismo do gado).

Na Índia, em Calcutã, o *C.botulinum* tipo A foi demonstrado em 4 de 8 amostras de solo de jardim (PASRICHA & PANJA, 1940).

A ocorrência de *Clostridium botulinum* em águas da Indonésia foi investigada por MORTJUDO et alii (1973), em 196 amostras de lama, areia, conteúdo intestinal de peixe e de outros animais marinhos. De 10 amostras tóxicas de lama e areia, foram isolados os tipo A, em 3 e os tipos B e C em 1. De 10 amostras tóxicas de peixe e outros animais, 1 continha tipo A; 7

tipo C; 1 o tipo D e 1 o tipo F.

3 - Características dos esporos

A grande importância de *Clostridium botulinum* nos alimentos, deve-se à sua capacidade de produzir esporos, os quais lhe permitem sobreviver aos processos de conservação utilizados, normalmente, para destruir a flora microbiana não esporulante. O esporo bacteriano é o mecanismo mais eficaz de sobrevivência na natureza.

Os esporos de algumas espécies de *Clostridium botulinum* estão entre os esporos bacterianos mais resistentes, tendo sobrevivido mais de 30 anos em meio líquido (HOFER & DAVIS, 1972), e diminuído sua população somente de $1,7 \times 10^6$ para $2,9 \times 10^5$, depois de 10 meses sob uma atmosfera simulada do meio ambiente de Marte, com temperaturas alternadas entre -25°C e 25°C (HAWRYLEWICZ et alii, 1962).

A produção de esporos varia muito de um tipo a outro. Um dos meios recomendados para esporulação é o de SUZUKI & GRECZ (1972) composto de: 5% de trypticase, 0,5 de peptona, 0,1% de tioglicolato de sódio e incubação a 30°C .

A maior parte dos estudos sobre resistência tem sido efetuada com os tipos A, B e E, por serem os mais frequentes nos casos de envenenamento. A avaliação da destruição térmica é normalmente expressa como valor "D" (tempo de redução decimal), ou seja o número de minutos necessários, a uma dada tem

peratura, para reduzir a contagem viável de uma suspensão de esporos para um décimo do valor original. Uma síntese de alguns valores "D" fornecidos pela literatura pode ser vista no Quadro 1.

QUADRO 1 - Resistência térmica de *Clostridium botulinum* tipos A, B, C e E.

TIPOS	VALOR D, EM MIN.	REFERÊNCIAS
A		
62 A	$*D_{112.8} = 1.23$	ITO et alii (1967)
12885 A	$D_{112.8} = 1.09$	ITO et alii (1967)
62 A	$D_{115,5} = 0,74$	SCHMIDT (1964)
B		
213 B	$D_{112.8} = 1.32$	ITO et alii (1967)
32 B	$D_{112.8} = 0,15$	ITO et alii (1967)
C		
468 C	$D_{104} = 0,90$	SEGNER & SCHMIDT (1971)
571 C	$D_{104} = 0,40$	SEGNER & SCHMIDT (1971)
6814 C	$D_{104} = 0,02$	SEGNER & SCHMIDT (1971)
E		
Saratoga E	$D_{77} = 1,95$	ITO et alii (1967)
Minnesota E	$D_{77} = 1,55$	ITO et alii (1967)
8 E	$D_{77} = 0,77$	ITO et alii (1967)

* $D_{112,8} = D$ a $112,8^{\circ}\text{C}$.

Como é possível observar pelos dados do Quadro 1, há grande variação de um tipo para outro e mesmo dentro destes ,

Na destruição dos esporos não há, aparentemente, nada mais do que inativação enzimática (SEBALD & IONESCO, 1972).

A resistência dos esporos de *Clostridium botulinum* ao calor é afetada, principalmente, pela temperatura na qual as culturas cresceram; a resistência é maior se as culturas cresceram a uma temperatura um pouco menor do que a ótima (SMIDT, 1977). Entretanto, SUGIYAMA (1951) achou esporos de *Clostridium botulinum* dos tipos A e B, formados a 37°C, mais resistentes - que os formados a 24,29 e 41°C.

Outro fator que afeta a resistência térmica é a presença de ácidos graxos no meio. Quanto maior a cadeia de carbonos do ácido graxo maior a resistência do esporo (MOLIN & SNYGG, 1967).

O pH também influe ZEZONES & HUTCHINGS (1965) determinaram a resistência térmica de esporos do tipo A em meios com pH 4, 5, 6 e 7 e acharam valores de $D_{115.5^{\circ}\text{C}}$ iguais, respectivamente a 0,128; 2,6; 4,91 e 5,15.

Os estudos sobre a destruição dos esporos pelo calor demonstraram que os esporos dos tipos A e B são particularmente resistentes e sobrevivem na água fervente por várias horas. Possuem um tempo de redução decimal a 121°C de, aproximadamente, 0,2 minutos. No entanto, os esporos de *Clostridium botulinum* tipo E são mais sensíveis ao calor, sendo destruídos rapidamente a 80°C, com um tempo de redução decimal, a esta temperatura, de cerca de 1,0 minuto (ROBERT'S & INGRAM, 1968; STUMBO et alii, 1950). O *Clostridium botulinum* tipo F ocupa uma posi

ção intermediária entre os tipos A, B e C, com alta resistência térmica (DOLMAN & MURAKAMI, 1961).

Os esporos de *Clostridium botulinum* são relativamente resistentes à luz ultravioleta e também à ação de álcoois, compostos fenólicos e mercuriais orgânicos (LECHOWICH, 1970). Eles são destruídos, ainda que lentamente, por óxido de etileno e formaldeído, com a mesma eficiência que por ácidos e bases fortes (WINARNO & STUMBO, 1971). Ácido ascórbico e dihidro ascórbico neutralizado são letais para esporos de *Clostridium botulinum*, tanto quanto para outros *Clostridium* (ELLER et alii, 1968).

4 - Toxinas botulínicas e sua ação

Todos os tipos de *Clostridium botulinum* (A-B-C-D-E-F-G) produzem toxinas de ação neuromparalítica, sendo proteínas sorologicamente específicas. Elas são sintetizadas dentro da célula bacteriana durante o crescimento e são liberadas durante sua lises (BONVENTRE & KEMPE, 1960). Observar Quadros 2 e 3.

A toxina botulínica é um dos venenos neuromparalíticos mais poderosos. Na forma purificada, 1 µg desta substância contém cerca de 200.000 doses letais mínimas (DLM) para camundongos de 20g. Embora a DLM para o homem não seja conhecida, suspeita-se de que não mais do que 1 µg de toxina seja fatal para o homem (MORTON, 1961).

Devido à grande porcentagem de mortes entre as vítimas, a doença torna-se mais trágica pelo súbito começo e pelo

fato de que o sistema nervoso central parece não ser afetado, e a vítima permanece consciente até o último momento. Ainda que os sintomas definitivos do botulismo existam (dificuldade para engolir e respirar, incapacidade de focalizar com um olho e paralisia das extremidades) a doença é de diagnóstico difícil, já que, no início, os sintomas são facilmente confundidos com os de outras doenças. Depois de um determinado período a natureza da enfermidade torna-se aparente, mas já é demasiado tarde para sua terapia. Em casos de botulismo, o único remédio conhecido é a administração rápida de antitoxina específica. O que significa que não só é necessário conhecer logo no início a natureza da doença, como o tipo da toxina (BOROFF & DASGUPTA, 1971). Os sintomas mais comuns de botulismo aparecem no Quadro 4.

QUADRO 2 - Relação das toxinas produzidas por *Clostridium botulinum* (SMITH, 1977).

DESIGNAÇÃO TÓXICA	A	B	C alfa	C beta	D	E	F	G
A	+++	-	-	-	-	-	-	-
B	-	+++	-	-	-	-	-	-
C ₁	-	-	+++	-	+	-	-	-
C ₂	-	-	+	+++	-	-	-	-
D	-	-	+	-	+++	-	-	-
E	-	-	-	-	-	+++	+	-
F	-	-	-	-	-	+	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	+

QUADRO 3 - Tipos de toxina botulínica e espécie susceptível (SMITH, 1977).

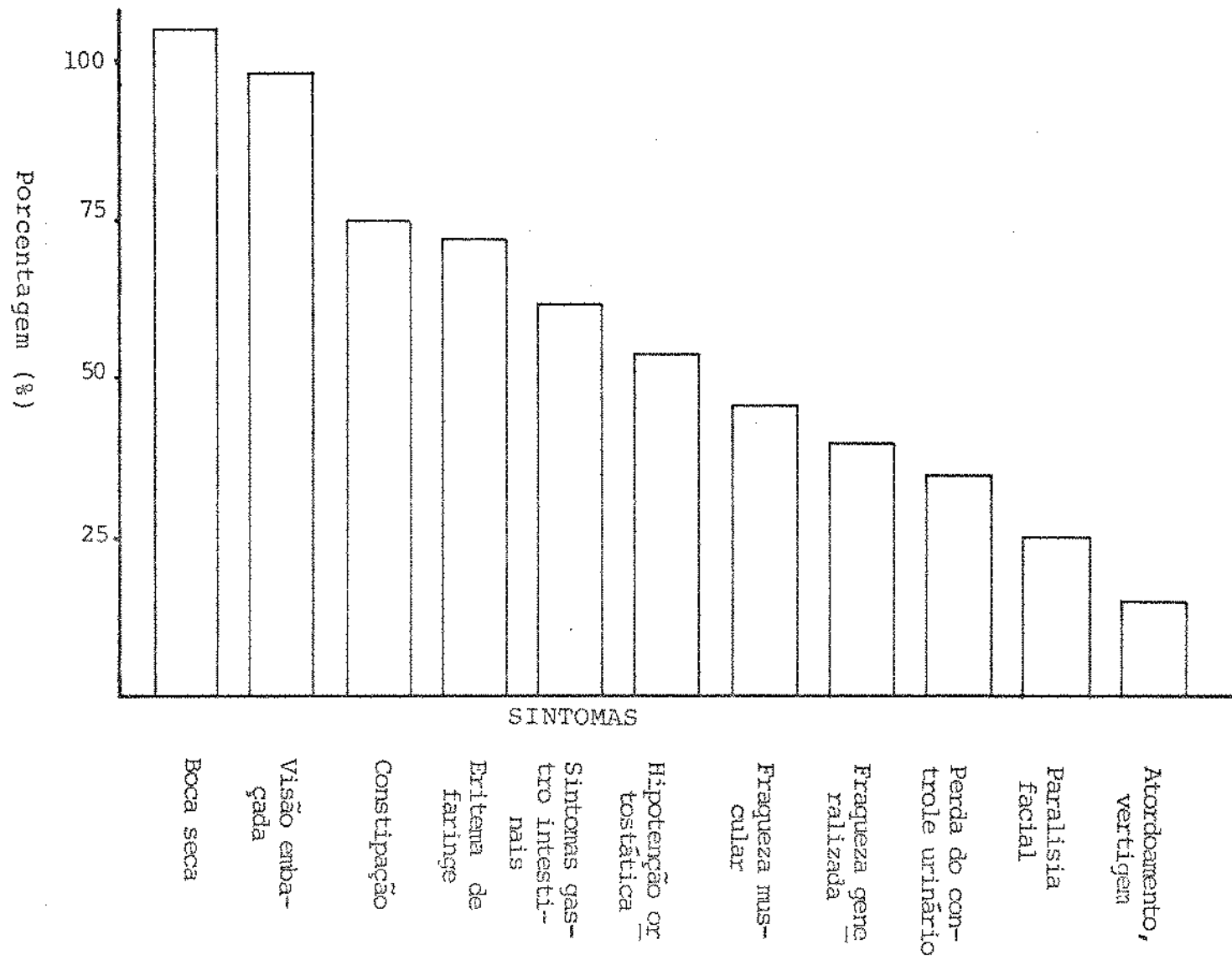
TIPO TOXINA	ESPÉCIES SUCEPTÍVEIS
A	homem,
B	homem, cavalo
C alfa	pássaro, tartaruga
C beta	bovino, ovino, cavalo
D	bovino, ovino
E	homem, pássaro
F	homem
G	não existem dados de surtos

5 - Isolamento

A demonstração de *Clostridium botulinum* realiza-se principalmente pela detecção de sua toxina, depois do que procede-se ao isolamento. Este é um processo lento, já que existem também alguns tipos não tóxicos ou microrganismos, como o *Clostridium sporogenes*, que possuem características culturais e sorológicas muito similares às de *Clostridium botulinum*, sendo a presença da toxina essencial para a identificação (KAUTTER, 1970; HOBBS, 1976).

Identificação da toxina em alimentos, solo ou outras amostras inoculando camundongos protegidos com antitoxinas específicas, é o mais usual. O isolamento de *Clostridium botu-*

QUADRO 4 - Frequência dos principais sintomas de botulismo na espécie humana
(BERNDT & STORCH, 1975).



linum é feito depois da detecção da toxina e todo pesquisador enfrenta os mesmos problemas. Dever-se-ia ou não aquecer a amostra para matar microrganismos não esporulados? Que meio usar? (KAUTTER, 1970).

BOTT et alii (1968) demonstraram que um choque térmico tão suave quanto 60°C já reduz a contagem de *Clostridium botulinum*; JOHNSON et alii (1964) optaram pelo uso de uma solução de etanol a 50%, em substituição ao aquecimento, para obter contagens mais altas de esporos viáveis, mas WARD et alii (1967a) verificaram que o álcool também diminui o número das contagens.

Quando os esporos são aquecidos, SMITH (1977) entende que a adição de 0,1% de amido solúvel ao meio de germinação, aumenta as contagens. Isto também já foi testado por WYNN & FOSTER (1948).

KRAVCHENKO & SHISHULINA (1967) testaram contagem de *Clostridium*, utilizando ambas as técnicas, a do álcool e a do aquecimento, e obtiveram um aumento de 29,7% na detecção do tipo A, e de 14,4%, no tipo B, quando usaram culturas não aquecidas.

HOBBS (1976) recomenda o aquecimento para o isolamento dos *Clostridium* A-B-C-D-F e o álcool, para o tipo E.

O meio preferido de enriquecimento para isolamento é a infusão de carne cozida com partículas de carne (SMITH, 1977). Entretanto, BOLT et alii (1968) acharam que a infusão de miolos e coração, mais carne cozida, de JOHANSEN (1963), permi-

tia obter 10 vezes mais toxina do que protease peptona-trypticase. Outro meio ainda é o agar *Clostridia* reforçado (HOBBS, 1976).

A temperatura de 30°C por 3 dias é favorável para todos os tipos de *Clostridium*.

As colônias que demonstram reação de lipase em agar gema de ovo (HOBBS et alii, 1971) devem ser repicadas para tubos com meio de carne cozida e incubada, por vários dias, a 30°C, sendo novamente testadas para a presença de toxidez (SMITH, 1977; TANASUGARN, 1979; HOBBS, 1976).

6. Surtos de botulismo

6.1. Botulismo no homem

Os casos de botulismo são ainda frequentes, especialmente em países cujos hábitos alimentares incluem o consumo de peixes salgados e defumados, carnes defumadas e, principalmente, derivados cárneos enlatados ou embalados.

Na Rússia ocorreram muitos surtos: em 1933, 230 pessoas foram afetadas com *C.botulinum* tipo A. Em 1934-1936, houve 40 surtos, devido ao consumo de peixe salgado ou defumado, com 350 casos (MATVEEN, 1959; DOLMAN, 1964). Atualmente, a situação é similar à dos Estados Unidos, com aproximadamente 15 a 20 surtos ao ano (MATVEEN, 1967).

Na França, no período 1940-1944, houve cerca de 500 casos, 93%, devido ao consumo de carne de porco (presunto, salsicha) LEGROUX et alii, 1947). Em 1947, 40 surtos aconteceram, depois disso o número de surtos caiu, porém 1956 a 1970, 66 surtos com 131 casos foram reportados por SEBALD (1970).

Na Inglaterra, de 1922 até 1935, foram registrados 30 casos de botulismo, a maioria devido a produtos de carne e peixes salgados (MEYER, 1956).

Na Escandinávia, sabe-se que pelo menos 17 surtos, foram devidos ao consumo de carnes e peixes salgados (SKULBERG; - 1964).

Na Alemanha, VERGE (1951) pesquisou os casos ocorridos de 1923 a 1948, em número de 357 surtos, envolvendo 950 casos. Carnes e produtos cárneos foram responsáveis por 86% dos surtos e o tipo predominante foi o B. (Quadro 5).

C. botulinum tipo E foi também reconhecido na Alemanha (BAUMGART, 1970) em filês de truta. Além disso, ocorreram 3 casos em pesquisadores que necropsiaram animais de laboratório, que tinham morrido pela administração da toxina A (von HOLZER, 1962).

Na Polônia, em 1959-1969, foram verificados 3430 casos de botulismo, 76% devido ao consumo de carnes, contendo a toxina de tipo B (ANUSZ, 1971).

Na Noruega, aconteceram 7 surtos, de 1964 a 1970 (HAUGE, 1970). Dois desses, pelo *Clostridium botulinum* tipo B em presunto, 4 pelo tipo E em peixe e 1 pelo tipo F, devido a salsicha.

QUADRO 5 - Botulismo humano na República Federal da Alemanha (1962-1973) Segundo BERNDT & STORCH, 1975).

ANO	CASOS
1961	86
1963	52
1964	82
1965	77
1966	63
1967	73
1968	53
1969	59
1970	44
1971	63
1972	47
1973	25

Na Suécia, de 1933 a 1972, 8 surtos ocorreram, e na Iugoslândia, de 1919 - 1960, 4 surtos (RALOVICH et alii, 1966).

Na Groenlandia, se conhece 1 surto, devido a *Clostridium botulinum* tipo E, envolvendo 25 pessoas, pelo consumo de carne de baleia (MULLER & THONSEN, 1968).

Na Suíça, KAUF et alii (1974) descreveram um surto com 48 pessoas afetadas com botulismo tipo B, pelo consumo de queijo tipo brie.

No Canadá, os casos de botulismo registrados entre 1961 a 1973, elevaram-se a 94, sendo 66 desses provocados pelo tipo E (DOLMAN, 1974).

Nos Estados Unidos, são inúmeros os casos de botulismo. No período 1899-1973 ocorreram 688 surtos reconhecidos, envolvendo 1784 pessoas, com 978 mortes (SMITH, 1977). Só em 1963, houve 17 casos de botulismo (ANON, 1964).

O *Clostridium botulinum* tipo A tem sido o mais frequente nos casos de intoxicação humana, representando, nos Estados Unidos, 70% dos casos registrados; o tipo B representa 19% o tipo E, 9,7% e o tipo F, 0,44% (SMITH, 1977).

Segundo DOLMAN (1964), no período de 1945 - 1962, ocorreram 18 surtos entre os esquimões do Alaska, devido a ingestão de mamíferos marinhos. Dados mais recentes revelaram que depois disso, de 1963 a 1973, houve mais 47 surtos no Alaska.

Atualmente, nos Estados Unidos, a média anual é de 15 a 20 casos de botulismo registrados. Em 1978 ocorreram 20 casos e em 1979, até o mês de agosto, 15 (MMWR, 1979)*.

O Quadro 6 representa uma relação dos alimentos envolvidos em casos de botulismo no homem.

No Japão, de 1951 até 1968, foram registrados 57 surtos, envolvendo 321 pessoas, devido ao consumo de peixes fermentados ou salgados; envolvendo o *C. botulinum* tipo E (NAKAMURA, 1963; MURATA, 1970).

A verdadeira incidência do botulismo não é conhe-

* Morbidity and Mortality Weekly Report

QUADRO 6 - Alimentos responsáveis por surtos de botulismo no homem. (1950-1973) (Segundo CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1974).

TIPO DE ALIMENTO	Nº DE SURTOS
Vagens verdes, feijão	17
Pimenta vermelha	10
Cogumelos	8
Beterraba	7
Carne de baleia e foca	7
Peixe defumado	5
Ovos de salmão	5
Outros vegetais (folhas)	4
Milho verde	3
Atum	2
Carne de boi com pimenta	2
Salmão defumado	2

cida com exatidão, já que depende muito da precisão do diagnóstico dos casos individuais. Em países onde o botulismo não é comum, esta doença é, em geral, mal diagnosticada, passando despercebida, já que não é considerada como uma possibilidade, até que um número grande de pessoas estejam envolvidas num surto. Além disso, às vezes é simplesmente associada a casos fatais de intoxicações alimentares inexplicáveis. O botulismo é reconhecido em um país, somente quando a classe médica é alertada sobre a pos

sibilidade desta doença pouco comum.

O botulismo nunca foi reconhecido no Japão, até 1951, quando 40 casos de botulismo foram constatados pela ingestão de um mesmo alimento à base de peixe, denominado de "izushi". Esse produto tem sido preparado do mesmo modo, durante anos, e casos de botulismo devem ter ocorrido sempre, sem serem detectados como tais (NAKANO & KODAMA, 1970).

6.2. Botulismo em animais

Ainda que a maioria dos animais seja suscetível à ação letal da toxina botulínica, ela só tem importância econômica em ovelhas, cavalos, bois e martas.

Os primeiros casos descritos referem-se ao botulismo de muares e equinos, denominado por BUCKEY & SHIPPEN (1917) de "Forage poisoning" (Envenenamento das forragens).

O botulismo em gado foi inicialmente descrito por GRAHAM & SCHWARZE (1921) e por SEDDON (1922a), principalmente na Austrália.

Em ovelhas, os estudos foram realizados por BENNETTS (1928), no Oeste da Austrália. No Sul da África, BEKKER & ROSSOUW (1930), demonstraram ser o botulismo a doença conhecida como "Lamziekt". O botulismo foi encontrado também em carnívoros (martas) por HALL & STILES (1938), em raposas (PYLE & BROWN, 1939) e em cachorros (LEGROUX et alii, 1947).

Em aves, o botulismo é conhecido nos Estados Uni-

dos, há várias décadas, também acontecendo no Canadá e Austrália. Trabalhos mais recentes indicam sua presença pelo mundo todo; na Suécia (NILEHM & JOHANNSEN, 1965); na Dinamarca, (MULLER, 1967); na Grã Bretanha (ROBERTS et alii, 1972); na Nova Zelândia (MARTINOVICH et alii, 1972); na África do Sul (HAY et alii, 1973).

Em gado, os tipos de *C. botulinum* responsáveis pelas intoxicações são normalmente os dos tipos C e D. Esses animais contraem botulismo comendo carcaças, ossos ou feno que foram contaminados com a toxina. Na África do Sul, o nome do botulismo é "lamsiekte"; na Austrália, "paralisia bulbar"; no Sul dos Estados Unidos, "loindisease" e no Senegal, como "Gniedo"; quando é contraída pelo feno ou silagem é chamada de "Forrage poisoning".

Ocorre principalmente, nas regiões onde o solo é deficiente em fosfato. Nesses lugares é comum que pequenos animais selvagens sejam portadores e que, no solo, estejam presentes esporos dos tipos C e D. Nessas condições, os animais apresentam deficiência de fósforo, adquirindo o hábito alimentar de comer ossos e carcaças de pequenos animais (Osteofagia) (JANSEN, 1963). Isto foi verificado em Cuba por ARENAS et alii (1957); no Senegal por CALVET et alii (1965); nos Estados Unidos por GRELEY & FRANKLIN (1967) e no Brasil por TOKARNIA et alii (1970), os quais, isolaram, de fezes e vísceras, de animais mortos pela doença denominada "mão dura", *Clostridium botulinum* dos tipos C e D. Nas regiões onde o "lamsiekte" é frequente, os criadores protegem os animais com vacina; mais de 5.000.000 de doses são

aplicadas anualmente no Sul da África (JANSEN, 1971).

Na intoxicação por feno ou silagens "forage poisoning", a fonte de toxina é usualmente o corpo de algum pequeno animal (rato, pássaro, sapo) que é acidentalmente morto e incorporado ao feno (PREVOT & SILLIOC, 1955). Esses animais são portadores de esporos e, com sua morte e decomposição, os esporos germinam e produzem toxina, tornando-se contaminantes de alimento (MULLER, 1963; FJOLSTAND & EKLUND, 1969).

Quando a carcaça de um animal, na qual se desenvolve *C.botulinum*, contamina uma fonte de água, a água torna-se tóxica, podendo permanecer assim por várias semanas (DOUTRE, 1969).

O botulismo em ovelhas é igual ao caso de bovinos. Grandes perdas de animais têm ocorrido na Austrália e África pela deficiência de fósforo (CALVET et alii, 1965). O tipo de *Clostridium botulinum* C é mais comum em ovelhas.

Botulismo em cavalos e mulas tem acontecido na Austrália, Bélgica, Dinamarca, Inglaterra, França, Holanda, Iugoslávia, Espanha, Estados Unidos e, na África do Sul (WILLEMS, 1954). Em todos os casos de botulismo em equinos, o tipo envolvido foi o *C. botulinum* tipos C e D. Estes animais são suscetíveis também ao tipo A (LEGROUX et alii, 1946) e ao tipo E (LEMAYTER et alii, 1953), mas se desconhecem casos de botulismo causado por estes tipos.

A fonte de toxina, nestes últimos casos, se deve principalmente, às carcaças de roedores ou de outros animais nas rações. Essas carcaças podem transformar-se em meios altamen-

te tóxicos, como por exemplo 5.000.000 DL para camundongos por grama, sendo que só 1g deste material pode ser letal para cavalos (MULLER, 1963).

Uns poucos casos de *C. botulinum* tipo B, em cavalos, foi demonstrado em Israel, devido ao consumo de batatas esmagadas junto à ração (KRUMHOLZ, 1962).

BOTIJA (1954) sugeriu que as fezes de gatos e camundongos são, frequentemente, fonte de *C. botulinum* e de sua toxina nas rações e silagens, já que, para os gatos, a toxina de *C. botulinum* tipo C beta é inócua por via oral devido a sua alta resistência. Um gato resiste a 2.000.000 DL para camundongo (PREVOT & SILLIOC, 1955); além disso, gatos são portadores não só do microrganismo como de sua toxina, sendo considerados como a principal causa do botulismo equino na Espanha.

Os sintomas são similares ao do botulismo em outros animais, sendo a paralisia posterior o primeiro sintoma, seguido por dificuldade para engolir e mastigar, respiração dificultada e morte por asfixia. Como nos outros animais, a análise após a morte não revela nenhuma característica.

Botulismo em martas é um problema comum para os criadores, produzindo enormes perdas econômicas, pois estes animais recebem grandes quantidades de carne e peixe na sua alimentação. O primeiro surto foi causado por *C. botulinum* tipo A (HALL & STILLES, 1938), mas são mais frequentes os surtos pelos tipos C e E (SKULBERG, 1961). AVERY et alii (1959) isolaram o tipo C de um surto produzido pela ingestão de fígado de porco.

Ainda que a maioria dos animais seja suscetível às toxinas botulínicas, existem poucos casos conhecidos para outros animais. Nestes casos, o tipo B foi o responsável, no Senegal ; na Austrália os casos demonstrados foram do tipo C (DOUTRE, 1967; BEIERS & SIMONS, 1967). Em raposas (BORIZOV & VAKUEY, 1969), os tipos conhecidos têm sido A e B. Em tartarugas, na Índia, o botulismo é conhecido como "Floppy Flipper" (REBELL, 1974).

Em aves, o botulismo ataca principalmente as selvagens, como patos e outras aves aquáticas. O principal responsável é o *C. botulinum* tipo C, mas existem outros surtos pelo tipo A (GENEROSO & SAN AGUSTIN, 1940) e pelo tipo E (FLAY et alii, 1965).

Em um surto, no lago Michigan, morreram 7.000 aves, entre gaivotas e melros (FLAY et alii, 1965).

Na parte Ocidental dos Estados Unidos, os surtos pelo tipo C mataram 10.000 patos selvagens, razão pela qual a intoxicação recebeu o nome de "Western duck disease". Essas aves disseminam esporos em outras regiões, quando migram. O *C. botulinum* se desenvolveria nas carcaças de pequenos invertebrados, sendo depois ingeridos pelas aves migratórias, junto com a toxina (JENSEN & ALLEN, 1960; HUNTER et alii, 1970).

Botulismo em faisões, pela ingestão de vermes com toxinas do tipo C, foi demonstrado por ROSEN (1959). Em frangos, HAAGSMA (1974) relatou um surto, com 30.000 mortes, pelo *C. botulinum* tipo C. Outros surtos foram relatados por BLANDFORD & ROBERTS (1970) e ROBERTS et alii (1973). No Brasil, SARAIVA (1976) isolou *C. botulinum* tipo C de galinhas intoxicadas pelo consumo de ração contaminada.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Material

1.1. Culturas padrões

Foram usadas culturas de *Clostridium* já tipificadas, fornecidas pelo Dr.G.K.York, da Universidade da Califórnia, U.S.A., e que formam parte da coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.* (Quadro 7).

1.2. Meios de cultura

Foram utilizados meios de culturas das marcas Difco e Oxoid

* Fornecidos gentilmente pelo Dr. Fumio Yokoya - UNICAMP.

QUADRO 7 - Culturas Tipificadas (coleção F.E.A.A. UNICAMP).

CULTURA	ESPÉCIE
Nº	
1	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo A 69
2	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo A 109
3	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo A 204
4	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo A 68
5	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo B 6
6	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo B 169
7	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo B 34
8	<i>Clostridium botulinum</i> Tipo E Minnesota
9	Anaeróbico putrefativo P.A. 3679

que são:

- Infusão de miolos e coração, Difco, mais 10% de pedaços de fígado fresco (TANASUGARN, 1979).

- Meio de carne cozida, Difco, (HOLMAN, 1953; ROBERTS, 1967; BOTT et alii, 1968; JOHANNSEN, 1963), mais adição de 0,3% de amido solúvel (WYNN & FOSTER, 1948).

- Agar gema de ovo, Difco, sem glicose (HOBBS, 1976; TANASUGARN, 1979).

- Agar de Clostrídios reforçado, Oxoid (ANGELOTTI et alii, 1962; BARNES et alii, 1963).

1.3. Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram produtos cárneos embalados a vácuo (sistema criovac): salsichas, presuntos e "bacons" de diversas marcas, adquiridos na região.

1.4. Soluções e reagentes

- Solução salina a 0,85% (SHARP, 1972).
- VAS-PAR, segundo WEISS (1957), que é uma mistura de vaselina e parafina p.a. em partes iguais.
- Solução tampão fosfato de gelatina (SMITH, 1977) constituída por volumes iguais de solução de gelatina a 0,4%, pH 6,5, misturada com volumes iguais de NaHPO_4 0,2M e KH_2PO_4 0,2M.
- Solução de tripsina (Difco, 1972): 1g tripsina Difco 1:250 diluída em 100 ml de água destilada e ajustada a pH 6,2.
- Solução de tampão fosfato pH 7,0 (FIELDS, 1975).
- Soluções de antitoxinas específicas para os *Clostridium botulinum* dos tipos A, B, C, D e E diluídos de acordo com as recomendações do Instituto Pasteur (1978), de modo que cada 0,1 ml contenha 1 Unidade Internacional.
- Gram: todas as soluções necessárias foram preparadas segundo a técnica de HUCKER, (SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGIST, 1957).
- Solução de antitoxina tetânica, Syntex.

- Soro antitetânico 1500 UI, Syntex

- As soluções e reagentes necessários para a realização das análises (determinação de nitritos, nitratos, cloreto de sódio, matéria graxa, teor de proteína, pH e umidade das amostras).

1.5. Equipamentos e vidraria

- Banho Ternostático, Ética (SP).
- Microscópio, Nikon de contraste de fase.
- Estufa Bacteriológica, Olidef CZ.
- Estufa Incubadora B.O.D., Fanem Ltda.
- Autoclave, Fabbe Ltda, mod.104.
- Bomba de Vácuo, Olidef Ac-45.
- Jarras Anaeróbicas, (BBL) mod.60465 Gas Pak.
- Estufa de 100°C Cenco Instruments Corporation.
- Microscópio Estereoscópico, Nikon mod.SMZ-6
- Balança, Bosch S2000.
- Homogeneizador.
- pHmetro, Horiba mod.H-5.
- Geladeiras, Gelomatic S.L.
- Centrífuga refrigerada, IEC, mod.B-20A.
- Manta aquecedora, Fisaton mod.402.
- Espectofotômetro, Baush & Lomb mod.Spectronic 88.
- Máquina para selar plásticos, Haramura H-Mini.
- Caixas de isopor.

- Termômetros,
- Gaiolas para camundongos.
- Seringas, Ibras_CBO.
- Tubos de ensaio com tampa rosqueável, pyrex.
- Dessecador, Pyrobras.
- Extrator Soxhlet, Coring,
- Micro Kjeldahl, Buchi Steam Generator 1500,
- e materiais comuns aos laboratórios de Microbiologia como: pipetas, placas de Petri, beakers, bastonetes, tubos de ensaio, filtros, funis, tubos de centrífuga, pinça, bandeijas, facas, tubos de latex, tesouras.

1.6. Animais de laboratório

- camundongos, *Mus musculus* albino pesando entre 22 e 25g.

2 - Métodos

2.1. Coleta e preparo das amostras

Neste estudo foram utilizadas amostras comerciais de produtos cárneos embalados a vácuo, à venda em supermercados e armazéns do interior do Estado de São Paulo. Estes produtos foram escolhidos por apresentarem características que poderiam favorecer o crescimento de *Clostridium botulinum*, já que são alimentos com alto teor de proteína, pH perto da neutralidade e embalados sob condições de anaerobiose. Além disso, grande parte dos casos de botulismo no mundo tem sido produzido pela ingestão deste tipo de alimento (KERNER, 1820, 1822; van ERMERGEN, 1897; TANNER & DACK, 1922; LEGROUX et alii, 1947; VERGE, 1951; JANUSZKIEWICA et alii, 1964; MULLER & THONSEN, 1968).

As amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo e analisadas uma hora depois, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Campus" de Jaboticabal - UNESP.

Na hora da aquisição, media-se a temperatura de armazenamento dos produtos adquiridos, já que este parâmetro é importante, pois a temperatura facilita o desenvolvimento destas bactérias.

No laboratório, procedia-se à divisão das amostras, na câmara asséptica, com material previamente esterilizado. O material era submetido a homogeneização durante 3 minutos, a 2500 r.p.m. com solução salina estéril, a 0,85% previamente refrigerada.

As quantidades de amostras e solução salina foram de 300g e 500ml, respectivamente, formando uma pasta semi-líquida segundo recomendações da A.O.A.C., (1965) e KAUTER (1964).

2.2. Técnica de enriquecimento

Das amostras homogeneizada, 11ml foram colocados, com uma pipeta adaptada (cortou-se a ponta e colocou-se um tubo de latex no outro extremo), em tubos de ensaio com tampa rosqueável, contendo 80ml dos meios de enriquecimento (infusão de miolo e coração mais fígado e caldo com carne cozida).

2.3. Preparo dos meios

Os meios de cultura foram todos preparados 24 horas antes das inoculações, sendo estes ajustados para pH 7,0-7,2, com NaOH 1 N (ZEZONES & HUTCHINGS, 1965; SEGNER et alii, 1971(a); 1971(b); ROBOHM, 1974). Todos os meios foram esterilizados a 121°C, durante 20 minutos, e armazenados à temperatura ambiente, já que as baixas temperaturas aumentam a solubilidade de gases, como oxigênio (MERCK, 1978).

Os meios para o crescimento em superfície, para estudo de características culturais e contagem de esporos viáveis (em placas de Petri) foram utilizadas logo após, seu preparo.

Quando foram utilizados meios líquidos, adicionou-se uma camada de 0,7 a 1 cm³ de vas-par esterilizado sobre

a superfície para auxiliar a anaerobiose (SOCIETY of AMERICAN BACTERIOLOGIST, 1957).

2.4. Choques térmicos

Os tubos, já selados com vas-par, foram submetidos a choque térmico em banho maria, a 80-82°C, durante 10 minutos e, logo após, resfriados a 28-30°C, com água gelada, com a finalidade de eliminar microrganismos contaminantes não esporulados, e, além disso ativar o processo de germinação (ANDO, 1973) e eliminar possível oxigênio dos meios. Essa temperatura pode destruir esporos de *Clostridium botulinum* tipo E (ANDO & IIDA, 1970; ANDO, 1971; HOBBS et alii, 1971), mas a incidência deste está relacionada, principalmente, a peixes e frutos do mar, e não a produtos cárneos.

2.5. Temperaturas e tempos de incubação

Os tubos com as amostras foram incubados a 30°C $\pm$ 1, durante 12 a 15 dias, em estufa B.O.D. (OHYE et alii, 1953; AJMAL, 1968; BRYAN et alii, 1971). A incubação das placas de Petri para o estudo das características culturais foi por período de 48 a 68 horas (SALETH & ORDAL, 1955; ROBERT'S & HOBBS, 1968).

2.6. Constatação de crescimento

A constatação de crescimento foi apreciada, nos

tubos, por uma marcada turbidez, mudança da cor original, produção de gases, fato facilmente visualizado pela subida do sêlo de vas-par, digestão das partículas de proteína (carne moída ou pedaços de fígado), produção de H_2S e odor característico.

O material dos tubos com crescimento foi dividido em duas porções, A e B, e armazenado a 4°C (SMITH, 1977). A porção A foi utilizada para a realização de testes de toxidez "in vivo" e a porção B, para a demonstração de cultivo do *Clostridium*.

2.7. Teste de toxidez "in vivo"

O líquido sobrenadante da porção A foi submetido à centrifugação, a 12.000 x g, a 4°C, durante 20 minutos, em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi removido com seringa esterilizada e submetido a uma segunda centrifugação, para obter um líquido bem clarificado. Este líquido foi armazenado 12 horas, à temperatura de 4°C, em tubos de ensaio previamente esterilizados, com a finalidade de não danificar as possíveis toxinas, se presentes, e também para reduzir as mortes dos camundongos, por causas não específicas (BOTT et alii, 1968; SEGNER & SCHMIDT, 1968; TANASUGARN, 1979).

A rotina recomenda utilizar diluições de 1:5 do fluido, com tampão fosfato de gelatina, para reduzir as mortes não específicas dos camundongos.

Uma quantidade de 0,5ml da diluição obtida foi

injetada intraperitonealmente em camundongos de 22 a 25g (dois camundongos por amostra). Os animais injetados foram observados, durante 4 dias, para detectar a presença de sintomas de botulismo (SMITH, 1977).

2.8. Teste de tripsinização

Como a toxidez de alguns tipos de toxina botulínica, como os E, B e F, é aumentada pela ação da tripsina (GORDON et alii, 1957; FLOCK et alii, 1961; KONDO et alii, 1970), submeteu-se uma parte do sobrenadante diluído, à tripsinização, misturando 9 partes do fluído com uma parte de solução de tripsina, o pH desta solução foi ajustado para 6,2 com HCl 1 N, e ela foi incubada, a 37°C, durante 45 minutos (EKLUND & POYSKY, 1972). Depois disto, 0,5ml foram inoculados, identicamente à ocasião anterior em camundongos, e de novo observados durante 4 dias, para detectar sintomas de botulismo. Para o conhecimento exato das reações e sintomas de botulismo, uma experiência piloto foi feita com um grupo de 32 camundongos (3 para cada tipo de *Clostridium* e uma amostra aquecida de cada tipo), submetidos à inoculação com toxinas botulínicas e posteriormente necropsiados.

2.9. Teste controle

Como as toxinas botulínicas são moléculas proteicas sensíveis ao calor, um camundongo, por amostra, foi inoculado com 0,5ml do mesmo material, mas aquecido à temperatura de

100°C, durante 10 minutos (para desnaturar), como controle.

Deste modo, na presença de toxinas botulínicas, os camundongos inoculados com as amostras normais ou submetidas a tripsinização deveriam morrer, enquanto que os camundongos inoculados com as amostras aquecidas, onde a toxina fora previamente desnaturada, sobreviveriam. Se os animais morriam, procedia-se à tipificação da toxina, utilizando antitoxinas específicas dos tipos A, B, C, D e E.

Quando não se dispõe de antitoxina botulínica do tipo F, a presença desta toxina é demonstrada utilizando-se antitoxina botulínica do tipo E que, normalmente, neutraliza a toxina tipo F, a qual é depois demonstrada pela inoculação do material em frangos. Esses animais morrem quando submetidos à toxina botulínica tipo E e, se não morrer, a toxina botulínica em questão é a do tipo F (GROSS & SMITH, 1971).

2.10. Teste de tipificação de toxinas

Para a tipificação das toxinas, utilizam-se antitoxinas específicas, procedendo como manda a rotina; diluem-se as antitoxinas, de modo que cada 0,1 ml contenha uma unidade internacional. No teste de neutralização, cada camundongo é protegido com uma U.I. Os animais assim protegidos são inoculados, normalmente, com o material a ser analisado, realizando-se também desta vez, uma inoculação com material aquecido, (controle). Deste modo deveriam morrer todos os camundongos, com exceção dos

protegidos com a antitoxina homóloga e do camundongo inoculado com o material aquecido (HOBBS, 1976; SMITH, 1977).

Os animais mortos eram necropsiados para a verificação de lesões internas, tais como: estado do fígado, do baço e presença de hemorragias.

2.11. Isolamento de *Clostridium botulinum*

A porção B foi utilizada para o isolamento do *C. botulinum*. Dos tubos contendo meio de enriquecimento com as culturas tóxicas, foram feitos plaqueamentos em duplicata, em agar gema de ovo sem glicose (HOBBS et alii, 1967; TANASUGARN, 1979) e em agar de clostrídios reforçado, Oxoid (ANGELOTTI et alii, 1962; BARNES et alii, 1963), recém-preparados e incubados em jarras anaeróbicas, com o sistema "GAS-PAK system" da B.B.L., à temperatura de 30°C, durante 48 a 72 horas.

As colônias foram observadas para determinar características culturais (bordas, forma, pigmentação), além de Gram e observação para a presença de esporos e sua posição na célula vegetativa. As colônias isoladas foram repicadas em placas com agar clostrídios reforçado, mas incubadas aerobicamente, à temperaturas de 30°C durante 24 a 36 horas, com a finalidade de provar sua capacidade de crescer na presença de oxigênio provando uma possível contaminação por *Bacillus*.

Das placas de agar gema de ovo, as colônias demonstrando reação de lipase positiva (zona opaca) (TANASUGARN, 1979)

foram transferidas para tubos com meio de carne cozida com glicose e incubadas, durante 6 dias, à temperatura de 30°C e, novamente testadas para a detecção de toxina botulínica.

2.12. Teste para *Clostridium tetani*

Os tubos com extratos tóxicos não identificados foram testados para a detecção de toxina tetânica (*Clostridium tetani*). Procedeu-se à proteção dos camundongos com vacina antitetânica, 6 dias antes da inoculação, ou aplicando 0,5ml de soro antitetânico por via intraperitoneal, 1500 UI, um dia antes da inoculação de amostras preparadas com a técnica já descrita.

2.13. Análise química das amostras destinadas a inoculação experimental.

A fim de verificar se o crescimento do *C. botulinum* é inibido pelas baixas temperaturas de armazenamento, ou pela presença de sais conservadores, ou pelos componentes da composição centesimal, 21 amostras de cada produto (presunto, sal-sicha, "bacon"), foram analisadas para a determinação de:

- nitrito
- nitrato
- cloreto de sódio
- teor de proteína
- teor de matéria graxa
- teor de umidade
- e pH

Essas determinações foram feitas com base na A.O.A.C. (1960, 1965) e LEES (1971).

2.14. Inoculação experimental com *Clostridium botulinum*.

Culturas de *C.botulinum* tipos A e B padrões foram repicadas nas infusões de miolo e coração, descritas anteriormente, e incubadas a 30°C, por 36-38 horas. Durante esse período acompanhou-se a esporulação microscopicamente, e depois, foram armazenadas a 4°C para diminuir a germinação dos esporos formados (CURRAN & PALANSCH, 1963).

Esse material foi centrifugado a 4.000 x g, durante 20 minutos. O material depositado foi ressuspenso em solução salina esterilizada e centrifugada novamente a 4.000 x g. Os esporos obtidos foram submetidos à limpeza com lisozima e tripsina, para eliminar restos de células vegetativas e nutrientes do meio, utilizando-se a metodologia de GRECZ et alii (1962). Os esporos limpos foram suspensos em solução de tampão fosfato pH 7,0.

Para determinar o número de esporos viáveis da suspensão, 1 ml da mesma foi submetido a choque térmico e semeado em placas com meio de agar clostrídio reforçado e em agar de gema de ovo em triplicata e incubadas a 30°C, anaerobicamente, durante 48 horas.

Amostras conhecidas quimicamente de presunto, sal-sicha e "bacon" foram inoculadas, com 2 ml da suspensão estoque, contendo uma concentração de $3,2 \times 10^6$ esporos por ml. Em seguida, foram embaladas, anaerobicamente, em sacos plásticos (SUGIYAMA & YANG, 1975) e armazenadas a 0°C, 2°C, 4°C, 6°C, 8°C, 12°C, 15°C, 20°C e temperatura ambiente ($27^\circ\text{C} \pm 2$), durante 20 ou 30

dias, depois dos quais foram analisadas para a detecção de toxina botulínica "in vivo", submetendo-se as amostras à homogeneização com solução salina estéril a 0,85% durante 3 minutos a 2500 r.p.m., seguindo-se o mesmo procedimento relatado nos itens 2.7; 2.8 e 2.9. Os animais foram observados durante 4 dias, para verificar sintomatologia de botulismo.

Como controle, foi também inoculado *C.botulinum* em coração de boi, pois o mesmo, era isento de nitrito, nitrato e sal e estocados as mesmas temperaturas já descritas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Temperaturas de armazenamento das amostras.

Nos Quadros 7 e 8 pode-se observar as frequências e variações das temperaturas de armazenamento dos produtos adquiridos na região de Jaboticabal, SP. Pela análise destes quadros, verifica-se que 16% (259) das amostras encontravam-se sob temperaturas acima de 4°C; 2,6% (42) das amostras estavam sob temperaturas superiores a 8°C, (temperaturas similares às obtidas em uma geladeira doméstica) e 1% (16) encontrava-se acima de 15°C. Estas temperaturas, em muitos casos, estavam bem longe das ideais para o armazenamento de produtos cárneos (0 a 4°C) e que poderiam permitir o desenvolvimento de *Clostridium*, FRAZIER

(1972).

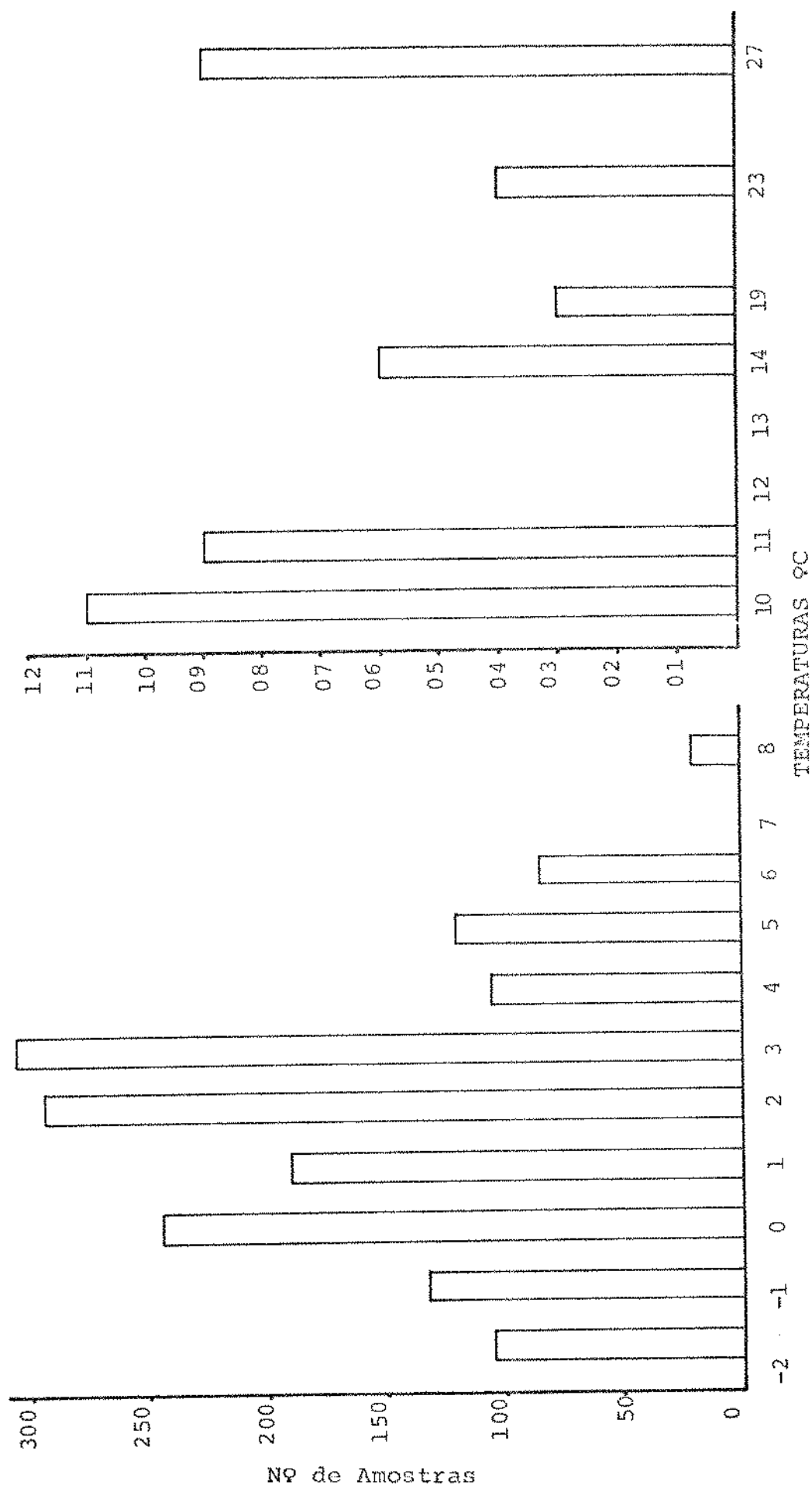
ROWLEY et alii (1970) relatam que *C.botulinum* pode crescer e produzir toxina a temperaturas de 3 a 4°C.

Estas temperaturas, segundo SCHMIDT et alii (1961a); ROBERTS & HOBBS (1968) e SMITH (1977), permitiriam o crescimento e a produção de toxinas de *Clostridium botulinum*, tornando-se estes produtos em alimentos altamente nocivos. Este fato, releva-se de importância pois, como pode ser observado, os produtos armazenados sofrem variações de temperaturas diariamente. Isto se deve ao desligamento dos congeladores ("Freezers") durante o período de fechamento dos estabelecimentos para economia de energia.

QUADRO 7 - Temperaturas das amostras de Presunto, Salsicha e "Bacon" na hora de sua aquisição na região de Jaboticabal - SP.

TEMPERATURA EM °C	Nº DE AMOSTRAS
-2	105
-1	127
0	244
1	183
2	290
3	306
4	100
5	114
6	85
8	18
10	11
11	9
14	6
19	3
23	4
27 $\pm$ 2 (ambiente)	9

QUADRO 8 - Distribuição da frequência das temperaturas de armazenamento dos produtos adquiridos para análise (Presunto, salsicha e "bacon").



2. Constatação de crescimento de anaeróbios do gênero *Clostridium* nas amostras incubadas.

Foram analisadas 1614 amostras em triplicatas, totalizando 4.842 análises realizadas nos diversos produtos, como pode-se observar no Quadro 9.

QUADRO 9 - Distribuição das amostras analisadas.

PRODUTO	Nº DE AMOSTRAS	Nº DE ANÁLISES
PRESUNTO	627	1.881
SALSICHA	504	1.512
"BACON"	483	1.441
TOTAL	1.614	4.842

Depois da incubação das amostras (ítems 2.1. a 2.6), pode-se observar a presença de crescimento bacteriano em 1.540 amostras (95,41%) demonstrado pela turbidez do meio original, de gradação parcial da carne moída, presença de gás e presença em alguns casos de H_2S . Observações similares de crescimento foram achados por BRYAN et alii (1971) e TANASUGARN (1979).

Nos Quadros 10 e 11, apresentam-se a distribuição e as características bioquímicas e de crescimento das bactérias anaeróbias, isoladas de presunto, salsicha e "bacon".

QUADRO 10 - Número e porcentagem de amostras de diferentes produtos que apresentaram crescimento em anaerobiose.

PRODUTO	Nº DE AMOSTRAS ANALISADAS	AMOSTRAS POSITIVAS	
		Nº	%
PRESUNTO	627	603	96,17
SALSICHA	504	481	95,43
"BACON"	483	456	94,40
T O T A L	1.614	1.540	95,41

A distribuição destes resultados (Quadro 10) foi: 603 amostras positivas de presunto (96,17%), 481 amostras positivas de salsicha (95,43%) e 456 amostras positivas de "bacon" (94,40%). As 74 amostras restantes (4,58%) não apresentaram alterações, conservando-se o meio translúcido, sem modificações e sem gás, fato que foi observado facilmente pelo não deslocamento da parafina.

Nestes quadros pode-se verificar que a contaminação por bactérias esporuladas anaeróbias é quase igual de um produto para outro. Com relação às características bioquímicas vemos que não há variações entre os produtos, demonstrando que a contaminação destes, por bactérias anaeróbias esporuladas, é elevado (95,41%).

Estes achados, não estão de acordo com os dados obtidos por ROBBS & ROBBS (1979), pois pesquisarão somente *C.*

QUADRO 11 - Características bioquímicas e de crescimento de bactérias anaeróbias, isoladas de presunto, salsicha e "bacon".

PRODUTO	ANÁLISES												Nº de amostras analisadas	
	Presença de gas			H ₂ S	Turbidez			Proteolise						
	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-		
PRESUNTO	330	143	77	77	72	555	374	149	104	301	107	56	163	627
SALSICHA	276	101	67	60	62	442	326	113	65	253	89	35	127	504
"BACON"	258	115	49	61	56	427	317	96	70	229	82	46	126	483

(+) pouco; (++) médio; (+++) muito; (-) negativo.

perfringens nos mesmos produtos na região de Rio de Janeiro. Entretanto, NARAYAN (1966) estudando *Clostridium* sp em carcaças de animais demonstrou 85,63% de contaminação; embora HOBBS et alii (1953) tenham constatado a presença de *Clostridium perfringens* em 20% das amostras de carne suína e 24% nas de carne bovina. HALL et alii (1963) demonstraram que 47,6% das amostras de linguiça analisadas, apresentavam *Clostridium* sp.

ABRAHAMSSON & RIEMANN (1971) estudando a prevalência de *Clostridium botulinum* em produtos cárneos semi-preservedos, acharam que 5% das amostras de presunto cozido analisadas continham toxina botulínica.

3. Teste de toxidez in "vivo" para demonstração de *C.botulinum*.

Visando detectar a presença de *C.botulinum* através da toxina produzida, foram inoculados os sobrenadantes das culturas em 2 camundongos por amostras, via intraperitoneal usando a metodologia descrita por SMITH (1977), (Ítem 2.7). Os resultados foram surpreendente já que logo no início, houve uma alta porcentagem de mortes, 24 horas após a inoculação. Inclusive, alguns animais morriam 10 a 15 minutos após a inoculação, com sintomas de paralisia. Por este motivo procedeu-se a realização de testes de tripsinização, controle e de tipificação (Ítems 2.8; e 2.10), os quais permitem obter maiores características sobre as toxinas em questão.

Segundo BOROFF & DASGUPTA (1971) nos casos em que a concentração de toxina for maior do que 1000 DLM/ml os camundongos morrerão dentro de 2 a 3 horas. Os testes de tipificação e controle se faz para poder indicar qual o tipo de toxina presente.

4. Teste de tripsinização

Depois de incubar as amostras suspeitas com tripsina (ítem 2.8) e inoculá-las novamente em camundongos, os resultados foram variados. Houve amostras que após a tripsinização perderam a toxidez, enquanto que, em outras não houveram alterações, permanecendo igualmente tóxicas. Não foi notado nenhum aumento de toxidez nas amostras que eram tóxicas antes do processo de tripsinização. Estes testes tem sido muito controvertidos. Entretanto, MEYER e LAMANNA (1959) testando a ação de enzimas proteolíticas, concluíram que todas as enzimas proteolíticas, com exceção da pepsina e papaina, inativam as toxinas botulínicas.

SAVIN (1966) demonstrou que depois de 2 horas de incubação a pH 5,0 a atividade da toxina aumenta, porém depois de 5 horas começa a decrescer. KONDO et alii (1970); FIOCK et alii (1961) e EKLUND & POYSKY (1972) relatam um aumento da toxidez depois da tripsinização.

5. Teste controle

Os resultados obtidos com o material utilizado como controle, (uma fração das amostras, aquecidas até desnaturação, (ítem 2.9) permitiram comprovar a presença de toxinas ter-

micamente lãbeis, jã que depois do aquecimento tornavam-se inõ-cuas, com exceção de 26 amostras, as quais permaneceram tõiicas apõs o aquecimento a 100°C durante 20 minutos. A relaçaõ destas amostras aparece no Quadro 12. A realizaçaõ de controles é recomendada por HOBBS et alii (1971) e SMITH (1977) para eliminar falsos resultados positivos de botulismo, fato que pode acontecer pela presença de substâncias tõiicas produzidas por outros microrganismos ou por substâncias quĩmicas presentes. Neste caso as amostras (Quadro 12) foram descartadas pelo fato de que se fossem toxinas botulĩnicas tornariam-se inõcuas com o aquecimento. As amostras restantes foram inativadas pelo calor podendo portanto ser botulĩnicas.

QUADRO 12 - Amostras de presunto, salsicha e "bacon" contendo substâncias tóxicas não desnaturáveis pelo calor, detectadas através da inoculação em camundongos.

Nº	AMOSTRA	PRODUTO
01	9	PRESUNTO
02	30	PRESUNTO
03	36	PRESUNTO
04	53	"BACON"
05	56	SALSICHA
06	61	SALSICHA
07	70	SALSICHA
08	71	"BACON"
09	91	SALSICHA
10	128	SALSICHA
11	140	PRESUNTO
12	170	SALSICHA
13	194	SALSICHA
14	216	PRESUNTO
15	311	PRESUNTO
16	388	"BACON"
17	894	PRESUNTO
18	1106	"BACON"
19	1218	"BACON"
20	1391	PRESUNTO
21	1450	PRESUNTO
22	1464	PRESUNTO
23	1472	SALSICHA
24	1505	"BACON"
25	1519	PRESUNTO
26	1537	PRESUNTO

6. Teste de tipificação para toxinas botulínicas

A realização do teste de proteção em camundongos com soros antibotulínicos específicos (item 2.10), descartou a possibilidade da presença de alguma toxina produzida por *C.botulinum* nestas amostras. Pois os camundongos protegidos com as antitoxinas botulínicas específicas morreram, sobrevivendo somente os camundongos inoculados com as amostras aquecidas (controles). Comprovou-se então, tratar-se de toxinas termolábeis diferentes das toxinas botulínicas conhecidas. Este fato, parece ser semelhante ao relatado por SMITH (1977) e RIEMANN (1973), quando descreveram morte de camundongos por causa inespecíficas. Entretanto, sugerem o isolamento do microrganismo, para poder determinar suas características e testar sua capacidade de produzir toxina, motivo pelo qual procedeu-se no presente trabalho à tentativa de isolamento de *Clostridium botulinum*.

7. Isolamento de *Clostridium botulinum*

Após o isolamento (item 2.11), foram estudadas as características morfológicas e biológicas das bactérias anaeróbias esporuladas isolados de presunto, salsicha e "bacon", que apresentaram toxidez quando inoculados em camundongos (Quadro 13). As amostras tóxicas, capazes de provocar a morte dos camundongos, foram testadas em animais protegidos com antitoxinas botulínicas. Todos os resultados foram negativos, concluindo-se que não se trata de nenhuma das toxinas botulínicas. Isto porque, todos os animais protegidos e não protegidos com antitoxinas morreram, sobrevivendo apenas os animais inoculados com a-

mostras aquecidas. Os resultados do presente trabalho corroboram aqueles achados por SMITH (1977) e HOBBS (1976), os quais recomendam esta técnica como a mais prática e segura para evitar resultados falsos positivos, produzidos por outros *Clostridium* como por exemplo o *Clostridium tetani*.

QUADRO 13 - Características morfológicas e biológicas de bactérias anaeróbias esporuladas isoladas de presunto, salsicha e "bacon" que apresentaram toxidez quando inoculadas em camundongos.

Nº DA AMOSTRA	PRODUTO	FORMA	GRAM	PRESENÇA E POSIÇÃO DO ESPORO	REACÇÃO DE LIPASE	CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS				TOXIDEX
						BOMBAS	FORMA	PRETEXTAÇÃO	ELEVADO	
6	SALSICHA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
12	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
28	SALSICHA	BT	+	T	+	IR	CR	CZ	LI	+
31	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
43	SALSICHA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
46	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	EC	+
63	"BACON"	BT	+	T	+	RZ	CR	CZ	LI	+
64	PRESUNTO	BT	+	T	+	IR	CR	CZ	LI	+
88	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	CR	AM	LI	+
100	PRESUNTO	BT	+	C	-	IR	CR	IN	LI	+
117	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	IN	EC	+
131	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	IN	EC	+
142	PRESUNTO	BT	+	T	-	RZ	CR	IN	EC	+
157	"BACON"	BT	+	T	-	RZ	CR	CZ	EC	+
163	SALSICHA	BT	+	T	+	RZ	CR	CZ	EC	+
170	SALSICHA	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	LI	+
182	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	EP	CZ	LI	+
196	SALSICHA	BT	+	C	-	RZ	CR	CZ	LI	+
197	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
213	"BACON"	BT	+	T	+	RZ	CR	CZ	LI	+
216	PRESUNTO	BT	+	T	+	RZ	CR	AM	EC	+
219	PRESUNTO	BT	+	C	-	RZ	CR	AM	LI	+
220	SALSICHA	BT	+	C	+	RZ	CR	IN	LI	+
225	"BACON"	BT	+	ST	-	RZ	CR	IN	LI	+
231	SALSICHA	BT	+	ST	+	IR	CR	IN	LI	+
249	PRESUNTO	BT	+	C	+	IR	CR	IN	EC	+
254	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	IR	CZ	EC	+
264	"BACON"	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	EC	+
265	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	EC	+
273	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	EC	+
281	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
282	PRESUNTO	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
288	"BACON"	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
295	PRESUNTO	BT	+	C	-	IR	CR	CZ	LI	+
310	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	EC	+
315	SALSICHA	BT	+	ST	-	RZ	CR	AM	EC	+
319	PRESUNTO	BT	+	T	-	RZ	EP	AM	LI	+
322	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	EP	AM	LI	+
328	SALSICHA	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	LI	+
332	SALSICHA	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	LI	+
338	"BACON"	BT	+	T	-	RZ	CR	CZ	LI	+
343	SALSICHA	BT	+	ST	+	IR	CR	CZ	EC	+
352	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	EC	+
368	PRESUNTO	BT	+	T	+	RZ	CR	CZ	LI	+

cont.

cont.

Nº DA AMOSTRA	PRODUTO	FORMA	GRAM	PRESUNÇÃO E POSIÇÃO DE ESPOROS	REACÇÃO DE LIPASE	CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS				TOXIDAZ
						BORDAS	FORMA	PIGMENTAÇÃO	ELEVACÃO	
377	"BACON"	BT	+	T	-	RZ	CR	CZ	LI	+
390	"BACON"	BT	+	C	+	RZ	IR	CZ	LI	+
397	SALSICHA	BT	+	ST	-	RZ	IR	AM	LI	+
417	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	AM	LI	+
430	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	AM	LI	+
434	PRESUNTO	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
447	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	CR	CZ	LI	+
459	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	CR	CZ	LI	+
475	PRESUNTO	BT	+	C	-	IR	CR	CZ	EC	+
513	SALSICHA	BT	+	-	-	IR	CR	CZ	EC	+
517	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	EC	+
524	"BACON"	BT	+	ST	-	RZ	IR	CZ	EC	+
527	SALSICHA	BT	+	C	-	IR	IR	CZ	EC	+
550	SALSICHA	BT	+	T	+	IR	IR	CZ	LI	+
565	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	IR	CZ	LI	+
579	SALSICHA	BT	+	ST	+	RZ	IR	CZ	LI	+
583	"BACON"	BT	+	T	-	RZ	EP	CZ	LI	+
587	PRESUNTO	BT	+	T	-	RZ	EP	CZ	LI	+
646	"BACON"	BT	+	ST	-	RZ	IR	CZ	LI	+
653	SALSICHA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
655	SALSICHA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
670	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	CR	CZ	LI	+
674	"BACON"	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
678	PRESUNTO	BT	+	T	-	IR	IR	CZ	LI	+
682	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	EP	CZ	LI	+
697	SALSICHA	BT	+	T	+	RZ	EP	CZ	LI	+
699	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
710	"BACON"	BT	+	C	-	IR	CR	CZ	EC	+
717	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	EC	+
726	SALSICHA	BT	+	C	-	RZ	CR	CZ	EC	+
733	"BACON"	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	LI	+
738	PRESUNTO	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	LI	+
745	PRESUNTO	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	LI	+
750	"BACON"	BT	+	T	+	RZ	IR	CZ	LI	+
760	SALSICHA	BT	+	ST	+	RZ	IR	CZ	LI	+
775	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	IR	CZ	EC	+
776	PRESUNTO	BT	+	ST	+	IR	CR	AM	EC	+
784	"BACON"	BT	+	T	+	IR	CR	IN	EC	+
792	SALSICHA	BT	+	ST	+	IR	CR	IN	EC	+
809	"BACON"	BT	+	C	-	IR	CR	CZ	LI	+
824	SALSICHA	BT	+	C	-	RZ	CR	CZ	LI	+
833	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
843	"BACON"	BT	+	T	+	RZ	CR	CZ	LI	+

cont.

cont.

Nº DA ANÁLISE	MICROTO	FUNDA	GRAM	PRENSÃO E POSIÇÃO DO ESPORO	REACÇÃO DE LIPASE	CARACTERÍSTICAS DAS COLÓNIAS				TOXIDEX
						BONDAS	FORMA	PIGMENTAÇÃO	ELEVACÃO	
851	SALSICIA	BT	+	T	-	RZ	IR	AM	LI	+
858	PRESUNTO	BT	+	ST	-	RZ	IR	CZ	LI	+
900	SALSICIA	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	LI	+
930	"BACON"	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	EC	+
939	SALSICIA	BT	+	T	+	IR	CR	CZ	EC	+
964	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
965	"BACON"	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
976	SALSICIA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
984	PRESUNTO	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
997	SALSICIA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1005	SALSICIA	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
1017	PRESUNTO	BT	+	T	-	IR	CR	AM	LI	+
1021	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1031	SALSICIA	BT	+	C	+	IR	CR	CZ	LI	+
1036	SALSICIA	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
1040	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1053	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	EP	CZ	EC	+
1057	SALSICIA	BT	+	ST	+	IR	CR	CZ	EC	+
1060	SALSICIA	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	EC	+
1067	"BACON"	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	EC	+
1071	"BACON"	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	LI	+
1083	PRESUNTO	BT	+	-	+	RZ	CR	CZ	LI	+
1090	SALSICIA	BT	+	ST	-	RZ	CR	IN	LI	+
1106	"BACON"	BT	+	ST	-	RZ	IR	AM	LI	+
1116	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	AM	LI	+
1131	"BACON"	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
1148	SALSICIA	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
1152	SALSICIA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1162	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	CR	CZ	EC	+
1178	SALSICIA	BT	+	C	-	IR	CR	CZ	EC	+
1194	"BACON"	BT	+	C	-	LI	CR	CZ	EC	+
1201	SALSICIA	BT	+	ST	-	LI	CR	CZ	EC	+
1212	PRESUNTO	BT	+	T	+	IR	CR	CZ	LI	+
1217	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	IR	CZ	LI	+
1223	"BACON"	BT	+	ST	+	IR	IR	CZ	LI	+
1237	PRESUNTO	BT	+	-	-	IR	IR	CZ	LI	+
1249	"BACON"	BT	+	ST	-	IR	IR	CZ	LI	+
1263	SALSICIA	BT	+	ST	-	IR	IR	CZ	LI	+
1291	PRESUNTO	BT	+	T	-	RZ	IR	CZ	LI	+
1295	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	LI	+
1304	SALSICIA	BT	+	C	+	RZ	CR	AM	LI	+
1320	SALSICIA	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	LI	+
1330	PRESUNTO	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	LI	+
1343	SALSICIA	BT	+	ST	+	IR	CR	CZ	LI	+

cont.

cont.

Nº DA AMOSTRA	PRODUTO	FORMA	GRAM	PRESENÇA E POSIÇÃO DO ESTORO	REACÇÃO DE LIPASE	CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS				TOXIGEN
						BORDAS	FORMA	PIGMENTAÇÃO	ELEVAÇÃO	
1362	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1369	SALSICHA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1379	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1383	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1408	PRESUNTO	BT	+	T	+	IR	CR	CZ	LI	+
1420	PRESUNTO	BT	+	T	-	IR	CR	IN	LI	+
1450	PRESUNTO	BT	+	ST	-	RZ	CR	IN	LI	+
1456	SALSICHA	BT	+	T	-	RZ	CR	IN	LI	+
1475	"BACON"	BT	+	T	+	RZ	IR	IN	LI	+
1476	"BACON"	BT	+	ST	+	RZ	IR	AM	EC	+
1477	"BACON"	BT	+	T	+	RZ	IR	AM	LI	+
1502	PRESUNTO	BT	+	T	-	RZ	CR	CZ	LI	+
1515	PRESUNTO	BT	+	T	-	EP	CR	CZ	LI	+
1530	PRESUNTO	BT	+	ST	+	RZ	CR	CZ	LI	+
1537	PRESUNTO	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	LI	+
1547	SALSICHA	BT	+	ST	-	RZ	CR	CZ	LI	+
1564	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1582	PRESUNTO	BT	+	T	-	IR	CR	CZ	LI	+
1588	PRESUNTO	BT	+	C	+	IR	CR	CZ	LI	+
1596	SALSICHA	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+
1599	SALSICHA	BT	+	-	-	IR	CR	CZ	LI	+
1605	PRESUNTO	BT	+	ST	-	IR	CR	CZ	LI	+

Obs.: + = Positivo; - = Negativo; BT = Bastonete; ST = Sub-terminal; T = Terminal; C = Central

IR = Irregular; RZ = Rizoide; LI = Lisa; CR = Circular; EP = Espalhada; CZ = Cinzenta;

ZM = Amarelada; IN = Incolor; EC = Elevadas no centro.

8. Teste para *Clostridium tetani*

O fato de ter culturas tóxicas termoláveis produzidas por bactérias anaeróbias, Gram positivas, esporuladas, capazes de provocar em camundongos convulsões e mortes, induziu a realização de análises para determinar a presença de *C. tetani* (Ítem 2.12). Este microrganismo pode causar a morte com sintomas parecidos ao botulismo em camundongos, quando em altas concentrações (SMITH, 1977). Depois da inoculação das amostras suspeitas em animais protegidos contra o tétano, observou-se a ocorrência de toxina tetânica em 17 amostras representando 1,05% do total analisado. A distribuição destes resultados é o seguinte: 11 amostras de presunto, 0,681% dos produtos analisados, 2 amostras de salsicha representando, 0,124% e 3 amostras de "bacon" representando 0,186% deste produto. A ocorrência de esporulados parece ser comum a estes tipos de produtos, porque as matérias primas entram em contacto com o solo, a água e fômites contaminados, já que o habitat natural do *C. tetani* é o solo e fezes de animais. Tal fato foi também descrito por HOBBS (1976) analisando peixes.

Após realizado este minucioso levantamento tentando o isolamento de *Clostridium botulinum* sem o conseguir, surgiram dúvidas sobre as seguintes questões: seriam os teores de cloreto de sódio, nitritos, nitratos e pH inibidores da germinação e crescimento dos esporos de *C. botulinum* ou seriam a sua composição centesimal e as temperaturas de armazenamento? Estas questões motivaram um segundo objetivo no sentido de realizar uma inoculação experimental em amostras de composição determina-

da e com isto tentar comprovar se há inibição do *C.botulínium* ou ausência destes nos produtos.

9. Análise química de amostras de presunto, salsicha e "bacon".

Para a realização de teste de inoculação experimental destes produtos com *Clostridium botulínium*, foram previamente analisadas quimicamente 21 amostras de cada produto visando determinar a sua composição centesimal e determinação de seu pH. Nos Quadros de 14 a 19, pode-se observar os resultados obtidos. Segundo HOBBS (1976) e RIEMANN (1971) estes fatores influenciam no crescimento do *C.botulínium*. As determinações de pH dos produtos estudados estão apresentados no Quadro 14.

QUADRO 14 - Determinação do pH nas amostras de presunto, salsicha e "bacon" de diversas marcas.(1)

PRODUTO	pH		MÉDIA DE pH
	Máximo	Mínimo	
PRESUNTO	6,61	6,45	6,53
SALSICHA	5,72	4,74	5,52
"BACON"	6,01	5,63	5,82

(1) 21 amostras por produto.

Pode se verificar neste quadro que os pH destes produtos variaram de 6,61 a 6,45 para os presuntos, de 6,01 a 5,63 para o "bacon" e de 5,72 a 4,74 nas salsichas, sendo que

estas teriam o pH mais baixo. Nestes pH há crescimento do *C. botulinum* pois a sua inibição pelo pH só ocorre abaixo de 4,5. Fato amplamente comprovado por HOBBS (1976). No trabalho de ROWEY & FEEHERRY (1977) comprovou-se que alguns esporos de *C. botulinum*, como os do tipo A, germinam a pH 5,0. INGRAM & HANDFORD (1957) demonstraram que não há crescimento em pH 4,5 porém, já deve ser prevenido seu crescimento em produtos com pH 4,8. Fato este comprovado também por TOWNSEND et alii (1954) os quais obtiveram crescimento e produção de toxina a pH 4,8.

No Quadro 15 apresentam-se os resultados obtidos na determinação de proteínas.

QUADRO 15 - Médias das porcentagens dos teores de proteína de presunto, salsicha e "bacon" de diversas marcas. (1)

PRODUTO	% DE PROTEÍNA
PRESUNTO	16,50
SALSICHA	13,31
"BACON"	08,70

(1) 21 amostras por produto.

Ainda que, os teores de proteína não variam muito para o mesmo produto, sua presença é indispensável para o crescimento de *C. botulinum* do grupo I e II (proteolíticos) (LANDGREBE & WEAVER, 1976; SMITH, 1977). O conhecimento dos teores de proteína, gordura e água são também necessários para calcular a concentração salina no produto (RIEMANN, 1971).

Nos Quadros 16 e 17 apresentam-se os teores de gordura e água das amostras.

QUADRO 16 - Médias das porcentagens dos teores de gordura obtidos das análises de presunto, salsicha e "bacon" de diversas marcas. (1).

PRODUTO	% DE MATÉRIA GRAXA
PRESUNTO	7,98
SALSICHA	14,53
"BACON"	68,60

(1) 21 amostras por produto.

QUADRO 17 - Médias das porcentagens dos teores de água (umidade) da análise de presunto, salsicha e "bacon" de diversas marcas. (1).

PRODUTO	% DE UMIDADE
PRESUNTO	70,37
SALSICHA	61,53
"BACON"	18,65

(1) 21 amostras por produto.

Outros fatores de suma importância no crescimento de *Clostridium botulinum* são os teores de cloreto de sódio e de nitrito, que estão representados nos Quadros 18 e 19.

QUADRO 18 - Médias dos teores de nitrito e nitrato obtidos de a
nálise de amostras de presunto, salsicha e "bacon"
de diversas marcas. (SCHOCKEN et alii, 1979). (1).

PRODUTO	TEORES DE NITRITO E NITRATO EM ppm			
	NITRITO			NITRATO
	Mínimo	Máximo	Média	
PRESUNTO	48,57	61,37	54,97	Traços
SALSICHA	52,84	75,86	64,35	"
"BACON"	39,19	52,84	52,84	"

(1) 21 amostras de cada produto.

QUADRO 19 - Médias das porcentagens dos teores de cloreto de sô
dio determinados em amostras de presunto, salsicha
e "bacon" de diversas marcas (1).

PRODUTO	PORCENTAGEM DE CLORETO DE SÓDIO		
	Mínimo	Máximo	Média
PRESUNTO	2,6	3,0	2,9
SALSICHA	2,8	3,3	3,0
"BACON"	4,0	5,0	4,6

(1) 21 amostras de cada produto.

Como se observa nos Quadros 18 e 19 os teores de nitrito e cloreto sódio das amostras variam de 39,19 para 75,86 ppm e de 2,6 a 5,0% respectivamente.

STEINKE & FOSTER (1951); ABRAHAMSSON (1964); SCHMIDT (1964) e PIVNICK et alii (1967) demonstraram que estes teores de nitrito não são suficientes para inibição dos *Clostridium botulinum*, mesmo na presença de 4% de cloreto de sódio.

Os teores de cloreto de sódio juntamente com os teores de proteína, umidade e gordura nos permitem determinar a concentração salina presente nas amostras (Quadro 20).

QUADRO 20 - Determinação da concentração salina nas amostras de presunto, salsicha e "bacon" de diversas marcas.(1).

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO SALINA EM %
PRESUNTO	3,15
SALSICHA	3,51
"BACON"	14,65

(1) 21 amostras de cada produto.

Neste quadro, pode-se verificar que os produtos analisados possuem uma concentração salina de 3,15% no presunto, 3,51% na salsicha e 14,65 no "bacon". Nos casos do presunto e da salsicha as concentrações salinas obtidas, permitem o crescimento de *C. botulinum*, pois, segundo RIEMANN (1971) é necessário uma concentração salina de 10% para inibir a germinação e desen

volvimento de esporos de *C.botulinum*. Somente no caso do "bacon" a concentração salina permitirá obter atividade de água que inibirá o crescimento de *C.botulinum*.

10. Inoculação experimental de *Clostridium botulinum* em amostras de presunto, salsicha, "bacon e coração de boi.

Os resultados obtidos das inoculações experimentais de presunto, salsicha, "bacon" e coração, aparecem nos Quadros de 21 a 24. Pode-se deduzir pelos resultados obtidos que os teores de cloreto de sódio, nitritos e nitratos não são fatores que garantem a inibição total do crescimento de *C.botulinum* nestes produtos, exceto "bacon". Estes achados encontram apoio nos trabalhos de BAIRD-PARKER & FREAME (1967); EMODI & LECHOWICH (1969); OHYE et alii (1967) que provaram ser necessário teores da ordem de 5 a 6% de cloreto de sódio para obter-se inibição de *C.botulinum*, experimentalmente. Enquanto que para os sais curantes, especificamente nitrito e nitrato, os teores necessários para a inibição do crescimento de *C.botulinum* deveriam ser da ordem de 300 a 400 ppm (TARR, 1942; STEINKE & FOSTER, 1951; ABRAHAMSSON, 1964; SCHMIDT, 1964). PIVNICK et alii (1967), trabalhando com produtos cárneos embalados a vácuo acharam que teores da ordem de 450 ppm de nitrito foram insuficientes para inibir *C. botulinum* tipos A e B. CHISTIANSEN et alii (1975) demonstraram que em salsicha com pH 5,2 - 5,9 e níveis de 150 ppm de nitrito não evitaram o crescimento de *C. botulinum*.

QUADRO 21 - Resultados de inoculações em camundongos, por via intraperitoneal, com amostras de presunto contaminados experimentalmente com $3,2 \times 10^6$ esporos de *C. botulinum* (tipos A e B) e armazenados sob diferentes temperaturas.

TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO °C	TEMPO ARMAZENAMENTO EM DIAS	Nº DE ANIMAIS INOCULADOS	Nº DE ANIMAIS MORTOS	% DE ANIMAIS MORTOS
2	30	06	00	00,0
2	20	06	00	00,0
4	30	24	09	37,5
4	20	12	06	50,0
5	30	18	15	83,3
6	30	18	07	38,8
10	20	18	09	50,0
12	20	14	09	64,3
14	15	06	00	00,0
16	20	06	01	16,6
18	15	18	05	27,7
27	15	12	08	66,6

QUADRO 22 - Resultados de inoculações em camundongos, por via intraperitoneal, com amostras de salsicha contaminadas experimentalmente com $3,2 \times 10^6$ esporos de *C. botulinum* (tipos A e B) e armazenados sob diferentes temperaturas.

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM °C	TEMPO ARMAZENAMENTO EM DIAS	Nº DE ANIMAIS INOCULADOS	Nº DE ANIMAIS MORTOS	% DE ANIMAIS MORTOS
0	20	16	00	00,0
2	20	06	00	00,0
4	20	12	03	25,0
6	30	06	05	83,3
8	20	06	00	00,0
10	20	06	06	100,0
12	20	14	06	42,8
14	20	06	00	00,0
16	20	06	01	16,6
20	20	12	03	25,0
27	20	06	06	100,0

QUADRO 23 - Resultados de inoculações em camundongos, por via intrapetitoneal, com amostras de "Bacon" contaminados experimentalmente com $3,2 \times 10^6$ esporos, de *C.botulinum* (tipos A e B) e armazenados sob diferentes temperaturas.

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM °C	TEMPO ARMAZENAMENTO EM DIAS	Nº DE ANIMAIS INOCULADOS	Nº DE ANIMAIS MORTOS	% DE ANIMAIS MORTOS
2	20	12	00	00,0
2	30	12	00	00,0
4	20	06	00	00,0
6	30	06	01	16,6
8	20	12	01	08,3
10	20	12	01	08,3
12	20	14	06	42,8
14	15	06	00	00,0
16	20	18	00	00,0
20	20	12	06	50,0
27	20	12	06	50,0

QUADRO 24 - Resultados de inoculações em camundongos, por via intraperitoneal, com amostras de coração de boi contaminados experimentalmente com $3,2 \times 10^6$ esporos de *C. ba*
tulinum (tipos A e B) e armazenados sob diferentes temperaturas.

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO EM °C	TEMPO ARMAZENAMENTO EM DIAS	Nº DE ANIMAIS INOCULADOS	Nº DE ANIMAIS MORTOS	% DE ANIMAIS MORTOS
2	30	06	00	00,0
4	30	06	04	66,6
6	30	06	01	16,6
10	20	12	12	100,0
12	20	10	04	40,0
27	15	08	06	75,0
30	15	06	05	83,3

Pode-se observar nestes quadros que houve crescimento de *C. botulinum* tanto nas amostras de coração como nos produtos contendo sais curantes (presunto, salsicha e "bacon"). No caso do "bacon" é necessário ressaltar que embora na determinação da concentração salina esta apresentasse uma média de 14,65%, houve crescimento de *C. botulinum*, sugerindo isto, que algumas amostras não possuíam teores suficientes para sua inibição.

O efeito da temperatura parece ser o fator mais importante na inibição de *C. botulinum*. Nos Quadros de 21 a 24, pode-se observar que os produtos armazenados a temperaturas inferiores a 4°C não tiveram crescimento, sejam estes produtos com sais de curados ou sem eles. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por ROWLEY & FEEHERRY (1970) que verificaram crescimento a temperatura de 4°C, bem como os trabalhos de ROBERTS & HOBBS (1968) e SMITH (1977) que observaram crescimento a 3°C e 3,3°C respectivamente. Comprovando-se deste modo que as baixas temperaturas impedem a germinação e crescimento de esporos de *C. botulinum*, sendo este o melhor método de inibição deste microrganismo.

Pode-se ainda observar que houve um crescimento mais intenso de *C. botulinum* na faixa de temperatura entre 4 e 14°C. Isto se deve, possivelmente ao fato de que nestas temperaturas as bactérias contaminantes não conseguem proliferar e assim competir com o *C. botulinum*. Tal fato não ocorre nas temperaturas mais elevadas (de 14 a 18°C) onde os contaminantes se desenvolvem mais rapidamente e desta forma competem com o crescimento do *C. botulinum*.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 - As condições de comercialização, não são satisfatórias, sugerindo um melhor controle e fiscalização na comercialização destes produtos;
- 2 - Estes produtos mal armazenados podem acarretar danos à saúde pública, devido a alta incidência de contaminantes anaeróbios que poderiam se desenvolver, por exemplo *C. perfringens*, *C. tetani*;
- 3 - Através da metodologia empregada, não pôde-se constatar a presença de esporos de *Clostridium botulinum* nos produtos examinados;
- 4 - Foi detectada a presença de dezessete amostras contaminadas com

esporos de *Clostridium tetani*, comsubstanciando que a presença de *Clostridium botulinum* é raro em nosso meio, entretanto, havendo presença de esporos de *Clostridium botulinum* nos produtos, haverá crescimento e produção de toxina;

5 - O nitrito, nitrato e cloreto de sódio em concentrações baixas, como as que foram determinadas não são suficientes para inibir os esporos de *Clostridium botulinum*;

6 - As temperaturas entre 0 e 2°C são as únicas que possuem efeito inibidor sob os esporos de *Clostridium botulinum*;

7 - Nas temperaturas entre 4 e 12°C há um maior crescimento de *Clostridium botulinum* porque os microrganismos contaminantes, nestas condições, não são competitivos;

8 - Em temperaturas superiores a 12°C o crescimento de microrganismos contaminantes é mais abundante e desta forma, capaz de competir com o *Clostridium botulinum* inibindo-o.

CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERTON, J.I. Pathogenic organisms in relation to pasteurised cured meats. D.F.M.I.R.A., 1963. (Sci. and Tech. Surv., 40).
- ANDO, Y. & KARASCHIMODA, T. Identification of the volatile acidic odors produced by *Clostridium botulinum*. In: HERZBERG M.ed. Toxic microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.
- ANDO, Y. & IIDA, H. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type E. Japan J. Microbiol., 14:361-370, 1970.
- ANDO, Y. The germination requirement of spores of *Clostridium botulinum* type E. Japan J. Microbiol., 15:515-525, 1971.
- ANDO, Y. Studies on germination of spores of clostridial species capable of causing food poisoning. I. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type A in a chemically defined medium. J. Food Hyg. Soc. Japan., 14:457-461, 1973.
- ANGELOTTI, R.; HALL, H.E.; FOTER, M.J.; LEWIS, K.H. Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. Appl. Microbiol., 10(3), 193-199, 1962.
- ANON. Botulism outbreak from smoked whitefish. Food Technology, Champaign, 18:71, 1964.
- ANUSZ, Z. Wstępna analiza epidemiologiczna zatruc pokarmowych wywołanych przez *Clostridium botulinum* w Polsce w latach 1959-1969. Polski tygodnik lekarski, 26:1491-1494, 1971.
- A.O.A.C. Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists. 10th Edition. Washington. Horwitz, William, 1965, 957p.

- A.O.A.C. Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists. 9th Edition. Washington. Horwitz, William, 1965, 957p.

- ARENAS.R.; PADRON,E.; ESPINOSA,A.; CORTIZO,J.; ZAMORA,N.;BLANCO,O.; CASTANER,J.; MORENO,A.; VALDES,F. Botulismo en el Ganado Vacune. Revista Med.Biol., 1:15-23, 1957.

- AVERY,R.J.; DOLMAN,C.E.; STOVELL,P.L.; WOOD,A.J. A natural outbreak of *Clostridium botulinum* type C intoxication in ranch mink arising from pork liver. Can.J.Camo.Med., 23:203-209, 1959.

- BAIRD-PARKER,A.C. & FREAME,B. Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spores and vegetative cell inocula. J. Appl. Bact. 35:420-429, 1967.

- BARNES,E.M.; DESPAUL,J.E.; INGRAM,M. The behaviour of a food Poisoning strain of *Clostridium welchii* in beef. J. Appl. Bact., 26 (3):415-427, 1963.

- BAUMGART,J. Nachweise von *Clostridium botulinum* type E. Bei-handelsfortigen Forellen Fleischwirtsch, 50:1545-1546, 1970.

- BAUMGART,J. Vorkommen und nachweis von *Clostridium botulinum* type E bei see fischem. Arch.Leben smittelhyg., 23: 34- 39, 1972.

- BEIERS,P.R. & SIMMONS,G.C. Botulism in pig. Austr.Vet.J.,43: 270-271, 1967.

- BEKKER,J.C, & ROSSOUW,S.P. A note on some conditions in speep in the strandveld of the Bredasdorp distric. 16 ed. South Africa, Diretor Vet.Ser.Animal.Ind., 1930 p.293-300.

CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSON, K. Studies on the effect of different, Chemical, inhibitors on the toxin production of *Clostridium butulinum*. Nord. Hyg. Tidskr, 45:49-51, 1964.
- ABRAHAMSSON, K; GULLMAR, B.; MOLIN, N. The effect of temperature on toxin formation and toxin stability of *Clostridium botulinum* type E in different environments. Can.J.Microbiol., 12:385-386, 1966.
- ABRAHAMSSON, K. and RIEMANN, H. Prevalence of *Clostridium botulinum* in semi preserved, meat-products. Appl.Microbiol., 21:543-544, 1971.
- AJMAL, M. Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* type E. J.Appl.Bact., 31:120, 1968.

- BENGSTON, I.A. Preliminary note on a toxin producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*. Pub. Healch. Rpts., 37:164-170, 1922.
- BENNETTS, H.W. Carrion poisoning of sheep (botulism). Austr. Vet.J., 4:105-106, 1928.
- BERNDT, S.F. & STORCH, H. Botulism in Bavaria: on botulinus intoxication and its therapy. Saravejo, 29(4), 1975.
- BLANDFORD, T.B. & ROBERTS, T.A. An outbreak of botulism in broiler chickens. Vet.Rec., 87:258-261, 1970.
- BONVENTRE, P.R. & KEMPE, L.L. Physiology of toxin production - by *Clostridium botulinum* types A and B. IV activation of the toxin. J. Bacteriol., 79:24-32, 1960.
- BORISOV, V.N. & VAKUEV, Y.I. Botulism in blue foxes. Vet.Bull., 39:2826, 1969.
- BOROFF, D.A. & DASGUPTA, B.R. Botulinum toxin. New York, Academic Press, 1971, vol.3. p.1-62.
- BOTT, T.L.; JOHNSON, J.; FOSTER, E.M.; SUGIYAMA, H. Possible origin of the high incidence of *Clostridium botulinum* type E. in an inland bay (green Bay of Lake Michigan). J.Bacteriol., 95:1542-1547, 1968.
- BOTIJA, C.S. Le botulisme des equides en Espagne. Bull of. In term. Epizoot, 42:759-764, 1954.
- BRYAN, A.H.; BRYAN, CH.A.; BRYAN, CH.G. Bacteriologia. 6 ed. Mexico, CECSA, 1971. 595p.
- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E.; BERGEY'S. Manual of determinative bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. 1268 p.

- BUCKLEY, J.S. & SHIPPEN, L.P. Preliminary report on the relation of anaerobic organisms to forage poisoning. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 3:809-816, 1917.

- BUTALOVA, E.; CHULKOVA, I.F.; ANISIMOVA, L.I. Detection in the USSR of *Clostridium botulinum* type F and its differential diagnosis with type E. Microbiol. Abs., 9:222, 1973.

- CALVET, H.; PICART, P.; DOUTRE, M.; CHAMBRON, J. Aphosphorose et botulisme au Senegal. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop., 18: 249-282, 1965.

- CANN, D.C.; WILSON, B.B.; HOBBS, G. Incidence of *Clostridium botulinum* in bottom deposits in British coastal waters. J. Appl. Bacteriol., 31:511-514, 1968.

- CARROL, B.J.; GARREL, E.S.; REESE, G.B.; WARD, B.Q. Presence of *Clostridium botulinum* in the gulf of Venezuela and the gulf of Darien. Appl. Microbiol., 14:837-838, 1966.

- CENTER, FOR DISEASE CONTROL: botulism in the United States, 1899 1973. Hand Book for epidemiologists, clinicians and Laboratory Worker, 1974.

- CHAPMAN, H.M. & NAYLOR, H.B. Isolation of *Clostridium botulinum* type E from Cayuga Lake fish. Appl. Microbiol., 14:301-302, 1966.

- CHRISTIANSEN, L.N.; TOMPKIN, R.B.; SHAPARIS, A.S.; KUEPER, T.V. ; JOHNSTON, R.W.; KAUTTER, D.D.; KOLARI, O.J. Effects of sodium nitrite on toxin production by *Clostridium botulinum* in bacon. Appl. Microbiol., 27(4):733-737, 1974.

- CHRISTIANSEN, L.N.; TOMPKIN, R.B.; SHAPARIS, A.E. Effect of sodium nitrite and nitrate on *Clostridium botulinum* growth and toxin production on a summer style sausage. J. Food. Sci., 40:488-490, 1975.

- CICCARELLI, A.S. & GIMENEZ, D.F. Cryoprotein produced by *Clostridium botulinum* type C. Infect.Immun., 5:985-986, 1972.
- COLLINS-THOMPSON, D.L.; CHANG, P.C.; DAVISON, E.M.; LARMOND, E.; - PIVNICK, H. Effect of nitrite and storage temperature on the organoleptic quality and toxicogenesis by *Clostridium botulinum* in vacuum-Packaged side bacon. J.Food.Sci., 39: 607-609, 1974.
- CRAIG, J.M. & PILCHER, K.S. *Clostridium botulinum* type F isolation from salmon from the Columbia River. Science, 153: 311-312, 1966.
- CURRAN, H.R. & PALLANSCH, M.J. Incipient germination in heavy - suspensions of *Bacillus stearothermophilus* at subminimal - growth temperatures. J.Bacteriol, 86:911-918, 1963.
- DAMON, S.R. & BAYABAL, L.B. Distribution of the spores of *Bacillus botulinus* e *Bacillus tetani* in the soil. J.infect. Dis., 34:491-501, 1926.
- DICKSON, E.C. "Botulism" the danger of poisoning from vegetables canned by the cold-pack method. J.Am.Med.Assoc., 69: 966-968, 1917.
- DICKSON, E.C. Botulism: a clinical and experimental study. Rockefeller, Inst. Med, 1918. p. 1-117. (Research Monog, 8).
- DIFCO Manual of Dehydrated culture Media and Reagents. 9 ed. Detroit, (Michigan) 1972. 350p.
- DOLMAN, C.E. & MURAKAMI, L. *Clostridium botulinum* type E with recent observation on others types. J.Infect.Dis., 109:107-110, 1961.
- DOLMAN, C.E. Botulism as a world health problem. In: Botulism

of a symposium. Welfare (Cincinnati), 1964. Proceedings.
p.5.

- DOLMAN, C.E. Human botulism en Canadá (1419-1973). Can. Med. J.,
110:191-200, 1974.
- DOUTRE, M.P. Première observation de botulisme C beta chez le
porc au Sénégal. Rev. Elev. Vet. Pays Trop., 20:351-353, 1967.
- DOUTRE, M.P. Premier observation de botulisme animal d'origi-
ne hydrique. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop., 22:25-31, 1969.
- DOZIER, C.C. Optimum and limiting hydrogen ion concentrations
for *B. botulinus* and quantitative estimation of its growth.
J. Infect. Dis., 35:105-108, 1924.
- EALES, C.E. & TURNER, A.W. Description of *Clostridium botulinum*
recovered from soil south Australia. Austr. J. Exper. Biol.
Med. Sci., 30:395-400, 1952.
- EASTON, E.J. & MEYER, K.F. Occurrence of *Bacillus botulinus* in
human and animal excreta. J. Infect. Dis., 35:207-212, 1924.
- EKLUND, M.W.; WIELER, D.I.; POYSKY, F.T. Outgrowth and toxin pro-
duction of non-proteolytic type B. *Clostridium botulinum* -
at 3, 3;5, 6°C. J. Bact., 93:1161-1463, 1967.
- EKLUND, M.W. & POYSKY, F.T. Distribution of *Clostridium botu-*
linum on the pacific, coast pf de United States in toxin
microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.
- EKLUND, M.W. & POYSKY, F.T. Activation of a toxin component of
Clostridium botulinum types C and D by Trypsin. Appl. Mi-
crobiol., 24(1):108-113, 1972.

- ELEER, C.E.F. & WYNNE, E.S. Sporocidal action of auto oxidized Ascorbic acid for *Clostridium*. Appl. Microbiol., 16: 349-354, 1968.
- EMODI, A.S. & LECHOWICH, R.V. Low temperature growth of type E *Clostridium botulinum* spores: 1 Effect of sodium chloride sodium nitrite, and pH. J. Food. Sci., 34: 78-81, 1969.
- ERMENGEN, E.M. van. Recherches sur des cas d'accidents alimentaires produits par des saucissons. Revue Hyg., 18: 761-798, 1896.
- ERMENGEN, E.M. van. Ueber einen neuen anaeroben *Bacillus* und seine beziehungen zum botulismus. Ztschr. Hyg. Infekt., 26: 1-56, 1897.
- FAHRAEUS, J. *Botulinum bacillus* and their occurrence in Sweden. State Bacteriological Laboratory, Stockholm, Sweden, 1949.
- FIELDS, M. Método para estudo das bactérias termófilas esporulantes com ênfase a solo e esterilização em indústrias de alimentos e saúde. Campinas, Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, 1975.
- FIOCK, M.A.; YARINSKY, A.; DUFF, J.T. Studies on the immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. VII Purification and detoxification of trypsin-activated type E toxin. J. Bacteriol., 82: 66-71, 1961.
- FJOLSTAND, M. & KLUND, T. An outbreak of botulism among ruminants in connection with ensilage feeding. Nord. Vet. Med., 21: 609-613, 1969.
- FLAY, L.D.; KAUFMAN, O.W.; RYEL, L.A. Mass mortality of water birds in lake Michigan, 1963-1964. Michigan, Great Lakes Division, 1965. (Publ. 13).

- FRAZIER, W.C. Microbiologia de los Alimentos Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1972, 512p.
- GENEROSO, J.D. & SAN AGUSTIN, F. Botulism in ducks along Laguna de Bay. Philippine. J. Animal Ind, 7:419-430, 1940.
- GIMENEZ, D. & CICCARELLI, A.S. *Clostridium botulinum* type F in the soil of Argentina. Appl. Microbiol., 16:732-734, 1968.
- GIMENEZ, D. & CICCARELLI, A.S. Another type *Clostridium botulinum*. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 215:221-224, 1970.
- GORDON, M.; FLOCK, M.A.; YARINSKY, A.; DUFF, J.T. Preparation purification and detoxification of type E. Toxin. J. Bacteriol, 74:533-538, 1957.
- GOUGH, B.J. & ALFORD, J.A. Effect of curing agents on the growth and survival of food-poisoning strains of *Clostridium perfringens* J. Food. Sci., 30:1025-1028, 1965.
- GRAHAM, R. & SCHWARZE, H. Botulism in cattle. J. Bacteriol., 6:69-83, 1921.
- GRAIKOSKI, J.T.; BOWMAN, E.W.; ROBOHM, R.A.; KOCH, R.A. Distribution of *Clostridium botulinum* in the ecosystem of great Lakes. In: HERZBERG, M. ed. Toxic. Microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.
- GRECZ, N.; ANELLIS, A.; SCHNEIDER, N.D. Procedure for cleaning of *Clostridium* spores. J. Bacteriol., 84:552-558, 1962.
- GREELEY, R.G. & FRANKLIN, F.E. Loin disease Southwest. Vet., 21:31-32, 1967.
- GREENBERG, R.A.; SILLKER, J.M.; FATLA, L.D. The influence of so

dium chloride and toxin production and organoleptic down in perishable cured meat inoculated with *Clostridium botulinum*. Food Technol. Champaign, 13:509-511, 1959.

- GRINDLEY, H.S. The influence of potassium nitrate on the action of bacteria and enzymes studies in nutrition. Urbana, University of Illinois, 1929.
- GROSS, C.E.; VINTON, C.; MARTIN, S.J. Bacteriological studies - relating to thermal processing of canned meats. Food. Res., 11:399-402, 1946.
- GROSS, W.B. & SMITH, L.D.S. Experimental botulism in galinaceous birds. Avian Dis., 15:716-722, 1971.
- HAAGSMA, J. Em vitbraak van botulismus bij Slachtkuikens. Tds chr. Diergen. Kunde., 99:979-990, 1974.
- HAINES, R.B. The occurrence of toxigenic anaerobes especially *Clostridium botulinum* in some English soils. J. Hyg., 42, 323-327, 1942.
- HALDANE, J.S. The red colour of salted meat. J. Hyg. Camb., 1:115-116, 1901.
- HALL, I.C. & STILES, G.W. An outbreak of botulism in captive - mink on a fur farm in Colorado. J. Bacteriol., 36:282, 1938.
- HALL, H.E.; ANGELOTTI, R.; LEWIS, K.; FOSTER, M.J. Characteristics of *Clostridium perfringens* strains associated with food and food-borne disease. J. Bact., 85:1094-1103, 1963.
- HANZEN, E.L. A strain of *B. botulismus* not classified as A, B, or C. J. Infect. Dis., 60:260-264, 1937.

- HAUGE, S. Botulismetilfeller; Norge lopet av de siste 5-6 yar. Norsk Vet-Tidsskr., 82:259-261, 1970.
- HAWRYLEWICZ, E.; COWDY, B.; EHRLICH, R. Microorganisms under a simulated martian environment. Nature, 194:497, 1962.
- HAY, C.M.E.; VAN DER MADE, H.N.; KNODETZE, P.C. Isolation of *Clostridium botulinum* in wild geese. J.S.Afr.Vet.Assoc., 44:53-56, 1973.
- HOAGLAND, R. Coloring matter of raw and cooked salted meats. J.Agric.Res., 3:211-212, 1914.
- HOBBS, B.C.; SMITH, M.E.; OAKLEY, C.L.; WARRAK, G.H.; CRUICKSHANK, J.C. *Clostridium welchii* foodpoisoning. Journal Hyg., 51:75-101, 1953.
- HOBBS, G.; STIEBRS, A.; EKLUND, M.W. Egg yolk reation of *Clostridium botulinum* in different basal meida. J.Bacterial., 93:1192, 1967.
- HOBBS, G.; WILLIAMS, K.; WILLIS, A.T. Basic methods for the isolation of Clostridia. In: SHAPTON, D.A. & BOARD, R.G. ed. "Isolation of Anaerobes". London, Academic Press, 1971. p. 1-23.
- HOBBS, G. *Clostridium botulinum* and its importance in fishery products. Advances in food research., 22:135-185, 1976.
- HOBBS, G. *Clostridium botulinum* and its importance in fishery products. Advances in Food.Research., 22:135-185, 1976.
- HOFER, J.W. & DAVIS, J. Survival and dormancy Tex.Med., 68:80 81, 1972.

- HOLMAN, E. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 7.ed. Washington, AOAC, 1953.
- HOLZER, von, E. Botulismus durch Inhalation Med Klinik. Munchem, 57:1735-1738, 1962.
- HOUGHTBY, G.A. & KAYSNER, C.A. Incidence of *Clostridium botulinum* type E in alaska salmon. Appl. Microbiol., 18:950-951, 1969.
- HUANG, C.T. Food customs and microbiol food poisoning. Suppl. Gazette, 17:1-8, 1969.
- HUNTER, B.F.; CLARK, W.E.; PERKINS, P.J.; COLEMAN, P.R. Applied botulism research including management recommendations Calif California, Dept. Fish and Game, 1970.
- INGRAM, M. & HANDFORD, M. The influence of moisture and temperature on the destruction of *Clostridium botulinum* in acid bread. J. Appl. Bact., 20:442, 1957.
- INSALATA, N.F.; FREDERICKS, G.J.; BERMAN, J.H.; BORKER, E. *Clostridium botulinum* type E in vacuum-packed fish. Food Technol., 21:296-298, 1967.
- INSTITUT PASTEUR. Necessaire pour la toxinotypie e botulique (Bula). Paris Institute Pasteur, 1978.
- ITO, K.A. SESLAR, D.J.; MERCERN, W.A.; MEYER, K.F. The thermal and chlorine resistance of *Clostridium botulinum* types A, B and E spores In: INGRAM, M. & ROBERTS, T.A. Botulism 1966. London, Champman and Holl, 1967.
- JANUSZKIEWICA, J. & PACHOWSHA - ONICHIMOWSKA, D. W. Sprawie - Niektorych objawow oxznych wzatrucin jaden kielbasianym.

Polski Tygodniki, 19:3-12, 1964.

- JANSEN, B.C. The importance of animal diseases in the Republic of South Africa. Bull. of Int. Epizoot., 59:1333-1350, 1963
- JANSEN, B.C. Veterinary medical research, education and service in the republic of South Africa. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 15:285-305, 1971.
- JEFFMAN, ISAAC. Aspectos bacteriológicos relacionados com o anaeróbio responsável pelo surto de botulismo em Porto Alegre, 1958. Revista Escola de Agronomia e Veterinária, 3: 37-47, 1960.
- JENSEN, L.B. & HESS, W.R. A study of the effect of sodium nitrate on bacteria in meat. Food. MF., 16:157-160, 1941.
- JENSEN, L.B. Microbiology of meats. 2.ed. Illinois, Garrard Press, 1954.
- JENSEN, W.E. & ALLEN, J.P. A possible relationship between aquatic invertebrates and avian botulism. Wildlife, Trans. N. Amer., Nat. Resources. Conf., 1960. p.171-180.
- JOHANNSEN, A. *Clostridium botulinum* in sweden and adjacent waters. J. Appl. Bacteriol., 26:43-47, 1963.
- JOHNSON, R.; HARMON, S.; KAUTTER, D. Method to facilitate the isolation of *Clostridium botulinum* type E. J. Bacteriol., 88: 1521-1522, 1964.
- JOHNSON, J.L. & FRANCIS, B. The taxonomy of the clostridia: Ribosomal homologies among the species. J. Gen. Microbiol., 88: 229-244, 1975.

- KAUF, C.; LORENT, J.P.; MOSIMANN, J.; SCHLATTER, I.; SOMAINI, B.; VELVART, J. Botulismus epidemie von type B. Schwiz. Med. Wschr., 104:677-685, 1974.
- KAUTTER, D.A. *Clostridium botulinum* type E in smoked fish. J. Fd. Sci., 29:843, 1964.
- KAUTTER, D.A. The detection, identification and isolation of *Clostridium botulinum*. HERZBERG, M. ed. Toxic Microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.
- KANAZAWA, K.; ONO, T.; KARASHIMADA, T.; ILDA, H. Distribution of *Clostridium botulinum* type E in Hokkaido, Japan. In: HERZBERG, M., ed. Washington, Dept. of interior, 1970.
- KERNER, C.A.J. (1820). Apud DICKSON. Neve Beobachtungen über die in Wurttemberg so häufig vorfallender tödtlichen vergiftungen durch in den genuss geraucherter wurste. Tübingen, 1918.
- KERNER, C.A.J. (1822). Apud DICKSON. Dassfettgift, ober die fettsaure, und ihre wirkungen auf den thierischen organismus. Ein beitrag zur untersuchung des in verdorbenen virken den stoffes. Tübingen, 1918.
- KODAMA, E. Epidemiological observation on botulism in Japan , Especially on the present status in the Akita prefecture. In: HERZBERG, M. ed. Toxin microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.
- KNOCK, G.C. Survey of soils for spores of *Clostridium botulinum* (Union of south African and Southwest Africa). J. Sci. Food. Agric., 3:86-91, 1952.

- KONDO, H.; KONDO, S.; MURATA, R.; SAKAGUCHI, G. Antigenicity of the formal toxoids derives from the precursor and the try-sin-activated toxin of *Clostridium botulinum* type E. In: HERZBERG, M. ed. Toxic Microorganisms. Washington Dept. of Interior, 1970.
- KRAVCHENKO, A.T. & SHISHULINA, L.M. Distribution of *Clostridium botulinum* in soil and water in the U.S.S.R. In: INGRAM, M. & ROBERTS, T.A. Botulism. London, Chapman and Hall, 1967.
- KRUMHOLZ, D. A botulism-like disease of equines in Israel Re fuah.Vet., 19:45, 1962.
- LANDGREBE, J.C. & WEAVER, R.H. Determination of amino acid by *Clostridium botulinum*. J.Bacteriol., 92:1565-1566, 1966.
- LANDMANN, G. Ueber die Ursache der Darmstadter Bohnenvergiftung. Hyg.Rundschau, 10:449-452, 1904.
- LEE, W.H. & RIEMANN: Correlation of toxin and nontoxic strains of *Clostridium botulinum* by DNA composition and homologies among the species. J.Gen.Microbiol., 88:229-244, 1970.
- LEES, R. Laboratory handbook of methods of food analysis. 2. ed. London, Leonard Hill, 1971 p.192.
- LECHOWICH, R.V. The effects of chemicals upon the growth of *Clostridium botulinum* In: HERZBERG, M., ed. Toxic microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.
- LEGROUX, R.; LEVADITI, J.C.; LAMY, R. Le botulisme experimental du cheval et la question du botulisme naturel. Ann. Inst. Pasteur, 73:545-552, 1946.

- LEGROUX, R.; LEVADITI, J.C.; JERAMEC, C. Le botulisme en France pendant l'occupation. Presse Medicale, 55:109-110, 1947.
- LEMAYTER, R.; NICOL, L.; GIRARD, O.; CORVAZIER, R.; CHEYROUX, M. Recherches sur le botulisme experimental chez de cheval. Bull Acad.Vet.France, 26:391-399, 1953.
- LEUCHS, J. Beitrage zu kenntnis des toxins und antitoxins des *Bacillus botulinus*. Ztschr.Hyg u Infekt., 65:55-84, 1910.
- MARTINOVICH, D.; CARTER, M.E.; WOODHOUSE, D.A.; McCAUSLAND. Au outbreak of botulism in wild waterfowl in New Zealand. New Zealand.Vet.J., 20:61-65, 1972.
- MASON, J.H. *Clostridium botulinum* type D in mud of lakes of the Zululand game parks. J.S.Afr.Vet.Med.Ass., 39:37-38, 1968.
- MATVEEV, K.I. (1959). "Botulism", Medgiz, Moscow (cited by Dolman, 1964).
- MATVEEV, K.I.; NEFEDJEVA, N.P.; BULATOVA, T.I.; SOKOLOV, I.S. Epidemiology of botulism in the U.S.S.P. In: INGRAM M., ed & ROBERTS, T.S. Botulism 1966. London, Chapman and Hall, 1967.
- MERCK Manual de Microbiologia. Barcelona (España), 1978. - 458 p.
- MEYER, K.F. & DUBOVSKY. The distribution of spores of *B.botulinus* in California. J.Infect.Dis., 31:541-555, 1922a.
- MEYER, K.F. & DUBOVSKY. The distribution of spores of *B.botulinus* in soils of central new York State. Food.Research, 11:203-209, 1922b.

- MEYER, K.F. Veber Botulismus: handburch der pathog, mikroorganismen. 4.ed. Kraus ublenhuth, 1928. p.1269.
- MEYER, K.F. & GUNNINSON, J.B. *Clostridium botulinum* type D sp. N. Proc.Soc.Exper.Biol.Med., 26:88-89, 1928.
- MEYER, K.F. & GUNNISON, J.B. Botulism due to home canned bartlett pears. XXXIV. J.Infect.Dis., 45:135, 1929.
- MEYER, K.F. & EDDIE, B. Fifty years of botulism in the United States and Canada. San Francisco, University of California, 1950. (Report George Williams Hooper Foundation).
- MEYER, K.F. The status of botulism a world health problem. - Bull. Wld.Hlth.Org., 15:281, 1956.
- MEYER, K.F. & LAMANNA, C. 1959. (Cited by Boroff & Dasgupta, 1971).
- MOLIN, N. & SNYGG, G.B. Effect of lipid materials on the heat resistance of bacterial spores. Appl Microbiol., 15: 1422-1426, 1967.
- MOLLER, V. & SCHEIBEL, I. Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Clostridium botulinum*. Acta. Pathol. Microbiol.Scand., 48:80, 1960.
- MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. Center for disease control, 26:14, 1979.
- MORTJUDO, J.W. & SIANGIAN, E.G.; SUHADI, F.; WARD, B.Q.; WARD, W. M.S. The presence of *Clostridium botulinum* in Indonesian waters. J. Appl.Bacteriol., 36:437-440, 1973.

- MORTON, H.E. The toxicity of *Clostridium botulinum* type A toxin for various species of animals including man. Institute for Cooperative Research Univ. of Pennsylvania, Philadelphia, 1961.
- MOULTON, R.C. & LEWIS, W.L. Meat through the microscope. 2.ed. Chicago, University of Chicago, 1940.
- MOULTON, R.C. Canner, convention number, 1930 (cited by ANDERTON, 1963).
- MULLER, J. Equine and bovine botulism in Denmark. Bull of Int. Epizoot, 59:1374-1390, 1963.
- MULLER, J. First outbreaks of botulism in wild ducks in Denmark. An account of the disease with discussion of the implications for public health, Medlemsbl. Danske Dyrlægeforen, 50, 887-890, 1967.
- MULLER, J. & THOMSEN, B.F. Et Udbrud af type E botulisme; Vestgrønland. Nord. Vet. Med., 20:479-485, 1968.
- MUNDT, J.O. & KITCHEN, H.M. Taint in Southern country-style hams. Food. Res., 16:233-235, 1951.
- MURATA, R. Perspectives of the botulism problem in Japan. In: HERZBERG, M. ed. Toxic microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.
- NAKANO, W. & KODAMA, E. On the reality of "Izushi", the causal food of botulism, and on its folkloric meaning. In: HERZBERG, M. ed. Toxic microorganisms. Washington, Dept. of Interior, 1970.

- NAKAMURA, Y. Botulism in Japan. Jap.J.Med.Sci.Biol., 16:304, 1963.
- NARAYAN, K.G. Studies on Clostridia incidence in the beef cattle. Acta.Vet.Acad.Sci.Hung, 16:65-72, 1966.
- NIELSEN, S.F. & PEDERSEN, H.O. Studies on the occurrence and germination of *Clostridium botulinum* in smoke salmon in botulism 1966. In: INGRAM, M.ed. & ROBERTS, T.A. Botulism. London, Chapman and Hall, 1967.
- NILEHN, P.O. & JOHANNSEN, A. Et utbrott. av aviar botulism. - Nord. Vet.Med., 17:685-692, 1965.
- OHYE, D.F. & SCOTT, W.J. The temperature relations of *Clostridium botulinum* types A and B. Aust.J.Biol.Sci., 6:178, 1953.
- OHYE, D.F. & SCOTT, W.J. Studies in the physiology of *Clostridium botulinum* type E. Aust.J.Biol.Sci., 10:85, 1957.
- OHYE, D.F. & CHRISTIAN, J.H.B. Combined effects of temperature pH and water activity on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* type A, B and E. In: INGRAM M.d, ed. & ROBERTS, T.A. Botulism 1966. London, Chapman and Hall 1967. p.217.
- PACE, P.V. KRUMBIEGEL, E.R. ANGELOTTI, R.; WISMIEWKI, H.J. Demonstration and isolation of *Clostridium botulinum* types from white-fish chubs collected at fish smoking plants of the Milwaukee area. Appl.Microbiol., 15:877-884, 1967.
- PARRY, E.W. Prevalence of *Clostridium botulinum* in soils of central New York state. Food Research, 11:203-209, 1956.

- PASRICHA, C.L. & PANJA, G. *Clostridium botulinum* in samples of Calcutta soil. Ind.J.Med.Res., 28:49-54, 1940.
- PEDERSEN, H.O. On type E botulism. J.Appl.Bacteriol, 18, 619-628, 1955.
- PERIGO, J.A.; WHITING, E.; BASHFORD, T.E. Observations on the inhibition of vegetative cells of *Clostridium botulinum* by nitrite which has been autoclaved in a laboratory medium, discussed in the context of sub-lethally processed cured meats. J.Food.Technol., 2:377-388, 1967.
- PIVNICK, H.; RUBIN, L.J.; BARNETT, H.W.; NORDIN, H.R.; FERGUSON, P.A.; PERVIN, C.H. Effect of sodium nitrite and temperature on toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in perishable cooked meats vacuum-packed in air-impermeable plastic pouches. Food. Technol.Champaign., 21:204-209, 1967.
- PREVOT, A.R. & HUET, M. Existence en France du botulisme humaine d'origine piscicole et de *Clostridium botulinum* E. Bull. Acad.Nat.Med., 135:432-435, 1951.
- PREVOT, A.R. & SILLIOT, R. Une énigme biologique chat et botulisme. Ann.Inst. Pasteur, 89:354-357, 1955.
- PREVOT, A.R. Manual for the classification and determination of anaerobic bacteria. Philadelphia, Lea and Febiger Monographs of the Paster Inst., 1966. 402p.
- PYLE, N.J. & BROWN, R.M. Botulism in foxes. J.Amer.Vet.Med.Assoc., 94:436-439, 1939.
- RALOVICH, B.; BARNA, K.; GRASCH, G.; PETZ, A. Toxikológiai es

bakteriológiai vizsgálttal igazolt. B.Tipusu botulismus -
Egeszsegtudomány, 10:342-351, 1966.

- REBELL,G. (1974) Apud SMITH. 1977.

- RIEMANN,H. Safe heat processing of canned cured meats with
regard to bacterial spores. Food.Technol, champaign,17:39
41, 1963.

- RIEMANN,H. A importância da Microbiologia na Indústria de A-
limentos, Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos,
26:57-72, 1971. (Tradução Yokoya,F.).

- RIEMANN,H. Botulinum food poisoning. J.Can.Inst.Food.Technol
6:111, 1973.

- ROBBS,N.K. & ROBBS,P.G. Condiciones microbiologicas de produ-
tos cárneos comercializados no Rio de Janeiro. Rev.Micro-
biol., 10(3):92-96, 1979.

- ROBERTS,T.A. Sporulation of mesophilic clostridia. J. Appl.
Bacteriol., 30:430-434, 1967.

- ROBERT'S,T.A. & HOBBS,G. Low temperature growth characteris-
tics of Clostridia. J.Appl.Bact., 31:75-88, 1968.

- ROBERT'S,T.A. & INGRAM,M. The resistance of spores of *Clos-*
tridium botulinum type E to heat and radiation. J. Appl.
Bact., 28:125-137, 1968.

- ROBERTS,T.A.; KEYMER,I.F.; BORLAND,E.D.; SMITH,G.R. Botulism
in birds and mammals in Great Britain. Vet.Rec.,91:11 - 12,
1972.

- ROBERTS, T.A.; THOMAS, A.I.; GILBERT, R.J. A third outbreak of type C botulism in broiler chickens. Vet.Rec., 92:107-109, 1973.
- ROBERTS, T.A. and SMART, J.L. The occurrence and growth of *Clostridium* spp. in vacuum-packed bacon with particular reference to *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum*. J.Food.Technol., 11:229-244, 1976.
- ROBOHM, A.R. Different pH optima in the two steps of an Indirect Fluorescent antibody reaction for *Clostridium botulinum* type E. Appl.Microbiol., 27:179-184, 1974.
- ROSEN, M.N. Immunization of pheasants with botulinum toxoid. - Calif. Fish and Game.Comm., 35:343-350, 1959.
- ROWLEY, D.B. & FEEHERRY, F. Conditions affecting germination of *Clostridium botulinum* 62 A spores in a chemically defined medium. J.Bacteriol., 104:1151-1157, 1970.
- SALETH, M.A. & ORDAL, Z.J. Studies on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in precooked frozen food. I. Some factor affecting growth and toxin production. Food.Res., 20:332, 1955.
- SARAIVA, D. Botulismo animal no Rio Grande do Sul. *Clostridium botulinum* tipo C em galinhas. In: CONGRESSO DE MICROBIOLOGIA, Porto Alegre, junho, 1976.
- SAVIN, V.R. In "Botulism 1966" M.Ingram and Roberts p.260. Chapman & Hall, London, 1966.
- SCHEUBER, J.R. A note on investigations into the distribution of the lamsiekte organism. (*Clostridium botulinum* Type C).

15. ed. South Africa, Ann.Rpt.Dir.Vet. Services, 1929. p. 223-226.
- SCHOCKEN, I.R.P.; FALEIROS, R.R.S.; SAMPAIO, A.A.M.; OLIVEIRA, M.D.S. Determinação de nitrito e nitrato em produtos cárneos comercializados. Científica., (Nº Especial):111- 114, 1979.
 - SCHOENHOLZ, P.; ESTY, J.R.; MEYER, K.F. Toxin production and signs of spoilage in commercially canned vegetable and fruits inoculated with de toxified spores of *B.botulinus*. J. infect.Dis., 33, 289, 1923.
 - SCHMIDT, C.F.; LECHOWICH, R.V.; FOLINAZZO, J.F. Growth and toxin production by type E *Clostridium botulinum* below 40°F. J.Food.Sci., 26:626-630, 1961a.
 - SCHMIDT, C.F.; LECHOWICH, R.V.; NANK, W.K. The significance of the radiation resistance of spores of type E *Clostridium botulinum* in relation to the extension of the refrigerated storage life of foods. 1961b.
 - SCHMIDT, C.F. Spores of *Clostridium botulinum*: formations resistance, germination. In: LEWIS, K.H. ed. Botulism. Dept. H.E.W. Cincinnati, 1964. p.69.
 - SCOTT, W.J. Factors in canned ham controlling *C.botulinum* and *Staphylococcus aureus*. Annls. Inst.Pasteur, Lplle, 7: 68-70, 1955.
 - SEBALD, M. Sur le botulisme en France de 1956 a 1970. Bull. Acad.Nat.Med., 154:703-707, 1970.
 - SEBALD, M. & IONESCO, H. Germination LzP- dependante spores de *Clostridium botulinum* type E.C. Rend.Acad.Sci.Paris, 275: 2175-2177, 1972.

- SEDDON, H.R. Bulbar paralysis in cattle due to the actions of a toxicogenic *Bacillus*, with a discussion on the relationship of the condition to the forage poisoning (botulism). J.Com.Pathol.Therap., 35:147-190, 1922a.
- SEDDON, H.R. The specific identity of *Bacillus parobotulinus* J. Compar. Pathol. Therap., 35:275-280, 1922b.
- SEGNER, W.P.; SCHMIDT, C.P. & BOLTZ, J.K. Effect of sodium chloride and pH on the out growth of spores of type E *Clostridium botulinum* at optimal and suboptimal temperatures. Appl. Microbiol., 14:49, 1966.
- SEGNER, W.P. & SCHMIDT, C.F. Nonspecific toxicities in the mouse assay test for botulinum toxin. Appl. Microbiol., 16:1105-1109, 1968.
- SEGNER, W.P.; SCHMIDT, C.F.; BOLTZ, J.K. Minimal Growth temperature, Sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. Appl. Microbiol., 22(6):1025-1029, 1971a.
- SEGNER, W.P.; SCHMIDT, C.F.; BOLTZ, J.K. Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C. Appl. Microbiol., 22:1017-1024, 1971b.
- SEGNER, W.P. & SCHMIDT, C.F. Resistance of spores of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. Appl. Microbiol., 22:1030-1033, 1971.
- SHARF, J.M. Exame microbiológico de alimentos. São Paulo, Polígono, 1972. 257p.
- SKULBERG, A. Botulism in mink caused by *Clostridium botulinum* type E. Nord. Vet. Med., 13:87-95, 1961.

- SUGIYAMA, H.; BOTT, T.L.; FOSTER, E.M. *Clostridium botulinum* type E in an inland bay (Green Bay of lake Michigan) In: Toxic Microorganisms, ed by M. Herzberg U.S. Dept. of Interior, Washington D.C. 1970.
- SUGIYAMA, M. & YANG, K.H. Growth potencial of *Clostridium botulinum* in fresh mushrooms packaged in semipermeable plastic film. Appl. Microbiol., 30:964-969, 1975.
- SUZUKI, J.B. & GRECZ, N. A study of metabolic factors involved in the intracellular germination of *Clostridium botulinum* spores after phagocytosis. J. Med. Microbiol., 5:381-390, 1972.
- TANASUGARN, L. *Clostridium botulinum* in the gulf of Tailand. Appl. Environ. Microbiol., 37:194-197, 1979.
- TANNER, F.W. & DACK, G.M. *Clostridium botulinum*. J. Infect. Dis. 31:92-100, 1922.
- TANNER, F.W. & EVANS, F.L. Effect of meat curing solutions on anaerobic bacteria. II sodium nitrate. Zentbl. Bakt. Parasitkde, 89:48-51, 1933.
- TARR, H.L.A. Bacteriostatic action of nitrites. Nature, London, 147:417-420, 1941.
- TARR, H.L.A. The action of nitrites in bacteria; further experiments. J. Fish. Res. Bd. Can., 6:74-77, 1942.
- TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.M.; DE CARVALHO, E.V. Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. Pesq. Agropec. Bras., 5:465-472, 1970.

- SKULBERG,A. Studies on the formation of toxin by *Clostridium botulinum* Oslo, Institute of food hygiene and microbiology , veterinary College, 1964.
- SLOCUM, G.C.; WELCH,H.; HUNTER,A.C. An outbreak of botulism - caused by home-canned tomatoes. Food.Res., 6:179,1941.
- SMITH,L.D.S. Common mesophilic anaerobes, including, *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* in 21 soil specimens. Appl. Microbiol., 29:590-594, 1975.
- SMITH,L.D.S. Botulism. Springfield, Charles C.Thomas, 1977. 236p.
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGIST. Manual of microbiological methods. New York, Mc Graw-Hill, 1957. 315p.
- STEINKE,P.K.W. & FOSTER,E.M. Botulinum toxin formation in liver sausage. Food Res., 16:477-479, 1951.
- STUART, P.F.; WIEBW,E.J.; MCELROY,R.; CAMERON,D.G.; TODD,E. D. D.; ERDMAN,I.E.; ALBALAS,B.; PIVNICK,H. Botulism among cape forest Eskimos and suspected botulism at Frobisher Bay and Wakeham Bay. Welfare, Food and Drug Dictorate, 1970, (Report. Dept.Nat).
- STUMBO,C.R.; MURPHY,J.R.; COCHRAN,J. Nature of thermal death time curves for P.A. 3679 and *Clostridium botulinum* Food. Technol., 4:321-323, 1950.
- SUGIYAMA, H. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. J.Bacteriol., 62:81 96, 1951.

- TOMPKIN, R.B.; CHRISTIANSEN, L.N.; SHAPARIS, A.B. The effect of iron on botulinal inhibition in perishable canned cured meat. J. Food. Technol., 13:521-527, 1978.
- TOWNSEND, C.T.; YEE, L.; MERCER, W.A. Inhibition of the growth of *Clostridium botulinum* by acidification. Food. Res., 19:536, 1954.
- VERGE, J. Toxic-infections animales et alimentation: le botulisme. Rec. Med. Vet., 127:767-828, 1951.
- WALLS, N.W. Physiological studies on *Clostridium botulinum* type F. In: INGRAM, M., ed. & ROBERTS, T. Botulism 1966. London, Chapman Hall, 1967. p.158.
- WARD, B.Q.; CARROL, B.L.; GARRET, E.S.; REESE, G.B. Survey of U. S. Gulf, coast for the presence of *Clostridium botulinum*. Appl. Microbiol., 15:629-636, 1967a.
- WARD, B.Q.; GARRETT, E.S.; REESE, G.B. Further indication of *Clostridium botulinum* in Latin American Waters. Appl. Microbiol., 15:1509, 1967b.
- WEISS, F.A. Maintenance and preservation of cultures. In: Manual of microbiological methods. London, Mc Graw-Hill, 1957. 315p.
- WENTZ, M.W.; SCOTT, R.A.; VENNES, J.W. *Clostridium botulinum* Type F; seasonal inhibition by *Bacillus licheniformis*. Science, 155:89-90, 1967.
- WENTZEL, S. BACH, R.; MÜLLER-PRASUHN, G.; GLAESKER, H. Teichfohlen als Träger von *Clostridium botulinum* und Ursache von Botulismus. Biol. Abs., 53:40-77, 1971.

- WILLEMS, R. Le botulisme du cheval. Bull of interm epizoot, 43: 482-495, 1954.
- WINARNO, F.G. & STUMBO, C.R. Mode of action of ethylene oxide on spores of *Clostridium botulinum* 62 A. Food. Sci., 36: 892-895, 1971.
- WYNN, E.S. & FOSTER, J.W. Physiological studies on spore germination with special reference to *Clostridium botulinum* J. Bacteriol., 55:61-73, 1948.
- YAMAMOTO, K.; KUDO, H.; ASANO, H.; SIETO, Y.; NABEYA, S.; HORIUCHI, Y.; AWASA, K.; SASAKI, J.; KIMURA, K. Examem do *Clostridium botulinum* dans les echantillons preteves au Lac. Med.J., 22: 92-96, 1970, apud. Biological Abstracts, 52:18862, 1970.
- YESAIR, J. & CAMERON, E.J. Inhibition effect of curing agents on anaerobic. spores. Cancer, 94:89-90, 1942.
- ZEZONES, H. & HUCHINGS, I.J. Thermal resistance of *Clostridium botulinum* (62 A) spores as effected by fundamental food - constituents. Food. Technol., 19:1003-1005, 1965.