

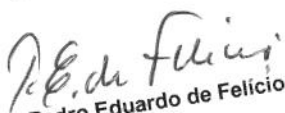
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Ocorrência de Toxinas em Carne Bovina Salgada e Levemente Dessecada,
Embalada a Vácuo e Inoculada com *Staphylococcus aureus* ou
*Clostridium botulinum***

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Margaret Yuriko Saiki**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de maio de 2002.

Campinas, 03 de maio de 2002.


Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício
Presidente da Banca

MARGARET YURIKO SAIKI

Médica Veterinária

Prof. Dr. PEDRO EDUARDO DE FELÍCIO

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas – SP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Sa 210
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49733
PROC 16-837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 18/06/02
Nº CPD _____

CM00169257-5

BIB ID 244863

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Saiki, Margaret Yuriko
Sa210 Ocorrência de toxinas em carne bovina salgada e levemente
dessecada, embalada a vácuo e inoculada com *Staphylococcus*
aureus ou *Clostridium botulinum* / Margaret Yuriko Saiki. –
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Pedro Eduardo de Felício
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Carne de sol. 2.Enterotoxinas. 3.*Staphylococcus aureus*.
4.Toxinas. 5.*Clostridium botulinum*. I.Felício, Pedro Eduardo
de. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

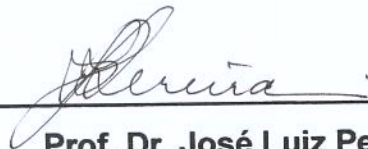


Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício
(Orientador/Presidente)



Dra. Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos
(Membro)

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(Membro)



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Campinas, de de 2002.

200226939

DEDICO

**Aos meus pais
Tsugueyoshi Saiki e Lygia Nakaoka Saiki
pelo imenso amor e incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício, minha imensa gratidão pela excelente orientação e ainda, por sua confiança, atenção e amizade;

Ao Prof. Bento da Costa Carvalho Jr, pela imensa colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo constante estímulo e amizade;

À Pesquisadora Valéria Christina Amstalden Junqueira, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, pela imensa colaboração no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão e ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, pelas valiosas sugestões e orientações durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Pesquisadora Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos, pelas sugestões dadas a este trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto, processo nº 1999/06581-6;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo;

Aos amigos José Roberto do Santos, Judite Lapa Guimarães, Adriana Pavesi Ariseto, Daniela Ferreira e Rogê Rego Barros, pela colaboração técnica e amizade;

À Maria Raquel Manhani, Dirce Yorika Kabuki e Norma Teruko Nago Miya, pela colaboração técnica e amizade;

À Elaine de Oliveira, pela ajuda nas análises microbiológicas;

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP;

À Luciana Miyagusku, pela orientação, confiança e incentivo;

Aos pesquisadores e funcionários do Centro de Tecnologia de Carnes – CTC;

À Da. Missaki Yamada, amiga em todos os momentos;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta tese;

A Deus, por tudo que tenho recebido.

Muito Obrigada.

ÍNDICE

Índice de Tabelas.....	ix
Índice de Figuras.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Objetivos.....	3
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – Carne-de-sol.....	4
2.2 – <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.1 – Histórico.....	6
2.2.2 – Características dos Estafilococos e das Enterotoxinas	7
2.2.3 – Mecanismo de Ação das Enterotoxinas.....	8
2.2.4 – Detecção de Enterotoxinas.....	9
2.2.5 – Habitat e Epidemiologia do <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.3 – <i>Clostridium botulinum</i>	12
2.3.1 – Histórico.....	12
2.3.2 – Características do <i>Clostridium botulinum</i>	13
2.3.3 – Mecanismo de Ação das Neurotoxinas.....	15
2.3.4 – Detecção de Neurotoxinas.....	16
2.3.5 – Habitat e Epidemiologia.....	16
2.4 – Conservação da Carne.....	18
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 – MATERIAL.....	21
3.1.1 – Matéria-prima.....	21
3.1.2 – Microrganismos.....	21
3.1.3 – Meios de culturas.....	21
3.1.4 – Equipamentos.....	22
3.1.5 – Outros.....	23

3.2 – MÉTODOS.....	24
3.2.1 – Processamento.....	24
3.2.2 – Embalagem.....	27
3.2.3 – Preparação dos Inóculos.....	27
3.2.3.1 – <i>Staphylococcus aureus</i> S6.....	27
3.2.3.2 – <i>Clostridium botulinum</i>	28
3.2.4 – Inoculação.....	28
3.2.4.1 – <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.2.4.2 – <i>Clostridium botulinum</i>	30
3.2.5 – Estocagem.....	30
3.2.6 – Detecção de Toxinas.....	31
3.2.6.1 – <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.2.6.2 – <i>Clostridium botulinum</i>	37
3.2.7 – Análises Microbiológicas.....	39
3.2.7.1 – Matéria-prima.....	39
3.2.7.2 – Produto.....	40
3.2.8 – Análises Físico-Químicas.....	40
3.2.8.1 – Determinação do pH.....	40
3.2.8.2 – Determinação do Potencial de Óxido-Redução.....	41
3.2.8.3 – Determinação da Atividade de Água.....	41
3.2.8.4 – Determinação de Umidade, Proteína, Cinzas e Cloretos.....	41
3.2.8.5 – Determinação de Lipídios.....	42
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5 – CONCLUSÕES.....	53
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1	Permeabilidade ao oxigênio das embalagens A e B.....	27
Tabela 2	Temperaturas e tempos de estocagem das amostras inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> ou com esporos de <i>Clostridium botulinum</i>	30
Tabela 3	Teores de umidade, proteína, lipídios, cinzas e cloreto de sódio na matéria prima e no produto.....	43
Tabela 4	Toxigênese em amostras embaladas a vácuo, inoculadas experimentalmente e estocadas a 30°C.....	46
Tabela 5	Toxigênese em amostras controle e inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i> , embaladas a vácuo e estocadas a 30°C.....	48
Tabela 6	Toxigênese em amostras controle e inoculadas com <i>Clostridium botulinum</i> , acondicionadas na embalagem A (9,6ccO ₂ /m ² /dia) e estocadas a 30°C.....	50
Tabela 7	Toxigênese em amostras controle e inoculadas com <i>Clostridium botulinum</i> , acondicionadas na embalagem B (40,0ccO ₂ /m ² /dia) e estocadas a 30°C.....	51

Índice de Figuras

Figura 1	Fluxograma do processamento da carne bovina salgada e levemente dessecada	26
Figura 2	Preparo da matéria-prima.....	24
Figura 3	Processo de salga.....	24
Figura 4	Processo de secagem em câmara climatizada.....	25
Figura 5	Carne salgada e levemente dessecada.....	25
Figura 6	Septo de silicone colado na região central da embalagem.....	29
Figura 7	Fluxograma das etapas de amostragem e obtenção do extrato para detecção de enterotoxinas de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Figura 8	Cartucho contendo os reagentes de reação.....	35
Figura 9	Esquema do Método ELFA.....	36
Figura 10	Fluxograma das etapas de amostragem e obtenção do extrato para detecção de toxinas de <i>Clostridium botulinum</i>	38
Figura 11	Análises microbiológicas da matéria prima e do produto embalado a vácuo, após 96 horas de estocagem a 0°C.....	44

RESUMO

Produtos cárneos com baixo teor de sal e alta atividade de água têm vida de prateleira reduzida à temperatura ambiente. A carne de sol, um produto tipicamente brasileiro, é elaborada de forma artesanal e tem uma duração média de três a cinco dias. Os princípios de boas práticas de fabricação, associados ao armazenamento refrigerado adequado e à embalagem a vácuo, permitem a conservação de produtos cárneos tradicionais de baixo teor de sal, por um tempo maior, para a comercialização a longas distâncias. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a segurança microbiológica de uma carne bovina salgada e levemente dessecada, com características físico-químicas similares à carne-de-sol, com teor de sal compatível ao paladar humano, sem necessidade de dessalga e acondicionada em dois tipos de embalagem a vácuo, de acordo com suas permeabilidades ao oxigênio ($9,6\text{ccO}_2/\text{m}^2/\text{dia}$ vs $40,0\text{ccO}_2/\text{m}^2/\text{dia}$). No processamento utilizou-se o coxão-mole bovino, cortado em fatias de 5,0cm de espessura, salgadas com 4% de sal e mantidas a 0°C por quatro horas. Em seguida, foi realizada a secagem em câmara climatizada durante quatro horas a uma temperatura média de $24,5^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 52,3%. Amostras do produto foram embaladas a vácuo e mantidas a 0°C por 24 horas e em seguida, inoculadas com *Staphylococcus aureus* S6 ou com *Clostridium botulinum* tipos A, B e E, e estocadas à 30, 22, 10 ou 4°C por diferentes tempos. Análises físico-químicas (pH, potencial de óxido-redução, atividade de água, umidade, proteína, cinzas, lipídios, cloreto de sódio) e microbiológicas (*Salmonella* sp., clostrídios sulfito redutores, *S. aureus*, enterobactérias, bactérias lácticas, bactérias psicrótróficas, bolores e leveduras) foram realizadas na matéria-prima e no produto. A detecção de toxinas de *S. aureus* foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELFA) no equipamento Mini-Vidas (bioMérieux) e a de *C. botulinum* através de ensaio biológico com inoculação em camundongos do tipo "Swiss". Toxinas de *S. aureus* foram detectadas, em ambas as embalagens, após dois dias de estocagem à temperatura de 30°C , e de *C. botulinum* tipos A e B após cinco dias de estocagem

na mesma temperatura, apenas nas amostras acondicionadas na embalagem de menor barreira, quando o produto já apresentava amaciamento excessivo, cor e odor alterados.

ABSTRACT

Meat products with low salt content and high water activity have a short shelf-life at ambient temperature. A typical Brazilian beef product, “carne-de-sol”, is traditionally made in small quantities at local markets and has an average time for consumption of three to five days. Principles of good manufacturing practices associated with proper cold storage and vacuum packaging could allow the preservation of low salt traditional meat products for longer time to make possible their marketing to distant areas. However, it is important to take into account the potential hazard of toxin formation in these products at abusive temperatures. This research work was carried out to evaluate the microbiological safety of a beef product with physico-chemical characteristics similar to “carne-de-sol”, having salt level compatible to consumers acceptance without desalting, vacuum packaged in two types of packaging films according to their oxygen barrier ($9.6\text{ccO}_2/\text{m}^2/\text{dia}$ vs. $40.0\text{ccO}_2/\text{m}^2/\text{dia}$). Boxed beef top round wholesale cuts were sliced in 5 cm thick steaks, added of 4% salt and kept in the cooler (0°C) for four hours. Following, the slices were hung in stainless steel carts which was taken to another cooler to be slightly dried at 24.5°C and 52.3% humidity for a four-hour period. Product samples were then vacuum packaged, inoculated with *Staphylococcus aureus* S6 or with *Clostridium botulinum* types A, B e E, and stored at 30, 22, 10 or 4°C for different times. Physico-chemical (pH, redox potential, water activity, moisture, protein, ashes, lipids and sodium chloride) and microbiological analysis (*Salmonella* sp., mesophilic anaerobic sporeformers, *S. aureus*, enterobacteriaceae, lactic acid bacteria, psychrotrophs, molds and yeasts) were performed in the raw material and in the processed product. Detection of *S. aureus* toxins was made through an ELFA immunoassay in the Mini-Vidas (bioMérieux) and those of *C. botulinum* were detected through biological assay using Swiss mouse. *S. aureus* toxins were detected in both packaging systems after two days at 30°C , and A and B botulinum toxins were detected after five days at the same temperature only in the package of the low barrier film, when the product have already presented excessively soft consistency, and altered color and odor.

1 – INTRODUÇÃO

A segurança microbiológica dos alimentos tem sido determinada através de testes de desafios, simulando os efeitos das condições do ambiente sobre os alimentos, em termos de crescimento e proliferação de microrganismos deterioradores e patogênicos (McDONALD & SUN, 1999).

A contaminação da carne pode ocorrer durante todas as operações de manipulação a que o referido produto seja submetido: abate, refrigeração, congelamento, processos de industrialização, divisão, embalagem, transporte, distribuição e manipulação doméstica (LEITÃO, 1984).

As características de composição, peculiares a cada tipo de produto cárneo, aliadas à diversidade de processamento e condições de embalagem, irão determinar a microbiota capaz de proliferar em um determinado produto, definindo o maior ou menor risco da presença e do crescimento de bactérias patogênicas (LEITÃO, 1978).

A carne fresca, por possuir em sua composição os principais nutrientes necessários ao crescimento microbiano, é um importante agente de infecções e intoxicações.

As intoxicações alimentares são devidas à ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas durante intensa multiplicação dos microrganismos. Os principais microrganismos causadores de intoxicações são: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* forma emética e os fungos produtores de micotoxinas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Levando-se em consideração a importância dos microrganismos na alteração da carne, se faz necessário retardar ou quando possível, inibir o crescimento microbiano (GARCIA et al., 1995; ELLIOTT, 1996; GILL, 1996).

A utilização industrial do cloreto de sódio na conservação das carnes antecede o surgimento da refrigeração. No Brasil, como em outras partes, essa prática visou, antes de tudo, a elaboração de produtos cárneos que pudessem ser comercializados por tempo mais longo e à longa distância (SHIMOKOMAKI et al., 1987).

A embalagem a vácuo prolonga a vida-de-prateleira dos produtos contra o desenvolvimento excessivo de microrganismos. A supressão do oxigênio estimula o crescimento de bactérias lácticas, capazes de produzir substâncias que podem inibir ou retardar o crescimento de microrganismos patogênicos (*Salmonella* sp., *Yersinia enterocolítica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*) e deterioradores (*Pseudomonas* spp. e enterobactérias) (GARCIA et al., 1995).

Tomando como base essas considerações, uma carne bovina salgada e levemente dessecada, com características físico-químicas similares às da carne-de-sol, com teor de sal compatível com o paladar humano foi processada, embalada a vácuo e experimentalmente inoculada com uma cepa de *Staphylococcus aureus* S6 ou com esporos de *Clostridium botulinum* tipos A, B e E, e estocadas em diferentes tempos e temperaturas para avaliação da produção de toxinas.

1.1 – Objetivos

- Avaliar a produção de toxinas de *Staphylococcus aureus* em amostras de carne bovina salgada e levemente dessecada, acondicionadas em dois tipos de embalagem a vácuo, através da inoculação de uma cepa de *Staphylococcus aureus* S6 e estocagem em diferentes tempos e temperaturas.
- Avaliar a produção de toxinas de *Clostridium botulinum* em amostras de carne bovina salgada e levemente dessecada, acondicionadas em dois tipos de embalagem a vácuo, através da inoculação de esporos de *Clostridium botulinum* tipos A, B e E, e estocagem em diferentes tempos e temperaturas.
- Avaliar a influência do tipo de embalagem no pH, atividade de água (Aa) e potencial de óxido-redução (Eh) da carne bovina salgada e levemente dessecada.

2– REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Carne-de-sol

A carne-de-sol é um dos mais antigos produtos da alimentação brasileira e seu consumo se concentra no Nordeste do Brasil. François Pyrard de Laval a encontrou à venda e sendo consumida em grandes quantidades na cidade de Salvador na Bahia, no ano de 1610 (FARIA, 1965, citado por VIEIRA NETO, 1982). Esse produto surgiu como uma alternativa na preservação do excedente de produção da carne bovina, devido às dificuldades para a sua conservação e pelo baixo nível econômico da população, carentes de sistemas de refrigeração adequados (COSTA, 1999).

A carne-de-sol apresenta valores médios de teor de sal na faixa de 5 a 6%, 64 a 70% de umidade (NORMAN & CORTE, 1985), e de atividade de água na faixa de 0,94 a 0,97 (COSTA, 1999). É um produto elaborado de forma artesanal, utilizando carne bovina, salga rápida e exposição ao sol ou ao vento, por curto espaço de tempo (CALDAS, 1966; VIEIRA NETO, 1982). Segundo NÓBREGA (1982), o sal adicionado no processo deve ser livre de impurezas, como cloretos e sulfatos de cálcio e de magnésio, que dificultam a penetração do sal na carne.

A vida-de-prateleira desse produto é de três a cinco dias, tempo insuficiente para se constituir em um produto industrial. NORMAN & CORTE (1985), consideram a vida-de-prateleira da carne-de-sol como equivalente à da carne fresca mantida sob refrigeração.

De acordo com NÓBREGA (1982), cada Estado tem sua tecnologia própria, resultando em produtos com características diferentes quanto ao aspecto de sabor, cor e tempo de conservação. Alguns pesquisadores têm se preocupado com a padronização das fases de elaboração deste produto, contribuindo com sugestões para modificações no seu processamento, como a utilização de nitrito ou nitrato de sódio e a adição de sorbato de potássio combinada ao acondicionamento a vácuo e sob refrigeração, retardando sua deterioração e

obtendo um produto com vida-de-prateleira média de até 20 dias (NÓBREGA, 1982; SHIMOKOMAKI et al., 1987).

A carne-de-sol deteriora-se pelo crescimento de uma microbiota mista, na qual predominam bolores e leveduras, que em pouco tempo forma uma camada de limo superficial de odor azedo (NÓBREGA, 1982). Esse produto preparado nas condições relatadas por VASCONCELOS (1986), pode resultar em um alimento contaminado por bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos capazes de colocar em risco a saúde do consumidor.

SILVA (1991) analisou 60 amostras de carne-de-sol comercializadas no Recife, e verificou que 25% das amostras de feiras livres e 5% das de supermercados tinham NMP $>10^4$ UFC/g de coliformes totais, e 70% das amostras de feiras livres tinham contagens maiores do que 10^2 UFC/g; a presença de *Escherichia coli* foi comprovada em 28,9% e de *S. aureus* em 23,3% do total de amostras analisadas. Das amostras de supermercados duas revelaram conter cepas produtoras de enterotoxina estafilocócica do tipo C e das amostras de feiras livres, uma apresentou cepa produtora de enterotoxina A. A autora concluiu que tais resultados evidenciavam condições higiênico-sanitárias de processamento e comercialização inadequadas.

Uma outra pesquisa realizada por COSTA (1999), analisou 48 amostras de carne-de-sol de frigoríficos e supermercados considerados inspecionados e 48 amostras provenientes de estabelecimentos não inspecionados. Os resultados revelaram contagens maiores nos estabelecimentos sem inspeção para as bactérias mesófilas, bolores e leveduras e coliformes fecais, enquanto que a contagem de *Staphylococcus* spp. foi maior nas amostras dos estabelecimentos com inspeção sanitária.

Um fator apontado como possível determinante para as altas contagens de microrganismos encontradas na carne-de-sol é o baixo teor de sal utilizado, suficiente para reduzir a atividade de água para valores próximos de 0,96, capaz de inibir o crescimento de *Pseudomonas*, mas favorecendo o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas, como as pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (COSTA, 1999).

2.2 - *Staphylococcus aureus*

2.2.1 – Histórico

Não há registros de quando a intoxicação estafilocócica foi observada pela primeira vez, mas há relatos da doença já no ano de 1830, embora o microrganismo só tenha sido observado em exsudados purulentos, em 1878, por Koch (BERGDOLL, 1979) e, em 1880, Pasteur cultivou o microrganismo em meio líquido (McCARTY, 1973).

Staphylococcus foi nomeado primeiramente por Ogston, em uma série de artigos publicados entre 1879 e 1882 (BAIRD-PARKER, 1990), demonstrando a patogenicidade do mesmo inoculando-o em camundongos e cobaias (McCARTY, 1973). Por causa de sua característica microscópica em forma de cachos, o *Staphylococcus* teve sua denominação derivada do grego “*staphyle*”, que significa cachos de uvas (BRYAN, 1976).

Rosenbach, em 1884, descreveu duas espécies denominadas *Staphylococcus pyogenes aureus* e *Staphylococcus pyogenes albus*, posteriormente denominados *S. aureus* e *S. epidermidis* (McCARTY, 1973).

Denys, em 1894, foi o primeiro a incriminar os estafilococos como uma causa de envenenamento. Durante a investigação de uma doença envolvendo pelo menos 8 casos de gastroenterites, ele verificou que as vítimas tinham consumido carne de uma vaca acometida de febre puerperal. Enorme quantidade de estafilococos foi isolada dessa carne e do baço de uma vítima fatal (BRYAN, 1976).

Embora Barber sugerisse que o envenenamento alimentar por estafilococos fosse causado por uma toxina, esse fato só foi provado em 1929, quando Dack et al., descobriram uma enterotoxina como a causa da doença (BRYAN, 1976).

2.2.2 – Características dos Estafilococos e das Enterotoxinas

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, isolados ou agrupados em cachos, pares e tétrades. São anaeróbios facultativos, não esporogênicos, produtores usuais de catalase e imóveis (KLOOS & SCHLEIFER, 1986). Um total de 28 espécies e oito subespécies já foram reconhecidas no gênero *Staphylococcus*, conforme apresentado na 9ª edição do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994).

A espécie *Staphylococcus aureus* é a que está mais frequentemente associada às doenças estafilocócicas (FRANCO & LANDGRAF, 1996), devido a sua capacidade enterotoxigênica, mas tal capacidade já não é mais exclusiva dessa espécie, uma vez que existem relatos de que outras espécies de estafilococos também possuem tal capacidade (OLIVEIRA, 1999).

Sete tipos antigênicos de enterotoxinas estafilocócicas "SE" são conhecidas: SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED e SEE (ICMSF, 1996). As enterotoxinas são proteínas simples de peso molecular de aproximadamente 30.000 daltons (SMITH et al., 1983), são higroscópicas e facilmente solúveis em água e solução salina (BERGDOLL, 1989). Essas enterotoxinas podem estar presentes em alimentos, mesmo que as análises microbiológicas apresentem resultados negativos quanto à presença de *S. aureus*; isto se deve ao fato destas proteínas apresentarem uma elevada estabilidade térmica (GOMEZ-LUCÍA et al., 1989), resistindo a uma temperatura de 121°C por três a oito minutos (BAIRD-PARKER, 1990).

Durante a realização de análises de alimentos suspeitos em laboratório, uma série de fatores podem interferir na produção e quantidade de enterotoxina estafilocócica, como por exemplo: pH, temperatura, atividade de água, concentração de NaCl, necessidades nutricionais e condições atmosféricas (GENIGEORGIS, 1989).

A temperatura ótima de crescimento de *S. aureus* está entre 35 e 40°C, mas as enterotoxinas podem ser sintetizadas em uma ampla faixa de temperatura que vai de 10 a 48°C (ICMSF, 1996).

O pH ótimo para o crescimento de *S. aureus* está entre 6,0 a 7,0, podendo crescer numa faixa de 4,0 a 10,0 (TATINI, 1973; ICMSF, 1996). Para a produção de suas enterotoxinas, o pH está numa faixa de 4,0 a 9,8 (TATINI, 1973).

A atividade de água para o desenvolvimento de *S. aureus* é superior a 0,99, com uma variação na faixa de 0,83 a valores superior a 0,99 (TATINI, 1973; ICMSF, 1996) e com relação à produção de suas enterotoxinas, esta pode ocorrer desde 0,86 até valores acima de 0,99 (TATINI, 1973).

Com relação à concentração de NaCl, *S. aureus* pode se desenvolver em concentrações de até 20% e para a produção de enterotoxinas há uma variação de 0 a 10% (TATINI, 1973).

Os estafilococos podem crescer sob condições anaeróbias e aeróbias, mas seu crescimento é mais lento anaerobicamente. As enterotoxinas podem ser produzidas em condições anaeróbias e foram detectadas SEB em carne curada armazenada a 22 e 30°C (GENIGEORGIS et al., 1969).

De acordo com BERGDOLL (1989), muitos estudos realizados sobre o crescimento de microrganismos e a produção de enterotoxinas em alimentos demonstram que, em geral, a produção de enterotoxinas é dependente da composição e da natureza física do produto, pH, umidade, atmosfera, tempo e temperatura de estocagem. Em adição, o tipo de cepa de *Staphylococcus* e o tamanho do inóculo.

2.2.3 – Mecanismo de Ação das Enterotoxinas

Os principais sintomas das intoxicações alimentares por estafilococos são vômitos e diarreias, que ocorrem entre uma a seis horas após a ingestão de alimentos contendo enterotoxinas (BERGDOLL, 1992), mas também podem ocorrer náuseas, dores abdominais e em alguns casos dores de cabeça (ICMSF, 1996). A recuperação é rápida, normalmente em dois dias (ICMSF, 1996). A morte

não é comum nesse tipo de intoxicação, mas há registros de mortes em crianças e idosos, freqüentemente devido a outras complicações (BERGDOLL, 1992).

A quantidade de enterotoxinas necessária para causar a doença depende do peso e da sensibilidade individual, mas estima-se que em geral menos de 0,1-1,0µg/Kg pode causar a doença em humanos. Um estudo realizado sobre um surto de intoxicação alimentar ocorrido em Madison - EUA, envolvendo estudantes que ingeriram leite achocolatado, possibilitou concluir que 200ng ou menos de enterotoxina A pode provocar intoxicação em indivíduos sensíveis (EVENSON et al., 1988).

De acordo com ICMSF (1996), o modo de ação das enterotoxinas não está totalmente elucidado, mas acredita-se que o vômito e a diarreia são resultados da estimulação dos neuroreceptores localizados no trato intestinal e transmitidos ao cérebro via vago e nervos simpáticos. Após a realização de ensaios em animais submetidos à vagotomia e simpatectomia, observou-se não haver resposta à ação das enterotoxinas (TRANTER citado por OLIVEIRA, 1999).

2.2.4 – Detecção de Enterotoxinas

Para a determinação da presença de enterotoxinas, são conhecidos os métodos biológicos e imunológicos, que estão em constante desenvolvimento na tentativa de aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de análise (OLIVEIRA & HIROOKA, 1996).

Os métodos biológicos consistem na administração intraperitoneal ou endovenosa de soluções, com concentrações variáveis de enterotoxinas, em gatos e administração oral em macacos *Rhesus* (*Macaca mulatta*) (VARADARAJ & RANGANATHAN, 1989). O método mais eficaz é através do ensaio biológico, utilizando macacos *Rhesus*, porque entre os diferentes metabólitos produzidos por estafilococos, somente as enterotoxinas são capazes de provocar reação emética em macacos (VARADARAJ & RANGANATHAN, 1989), o mesmo sintoma apresentado em humanos.

Os métodos imunológicos são baseados no uso de anticorpos preparados contra as enterotoxinas (ROBBINS & BERGDOLL, 1984). Reações específicas de precipitação em ágar ou agarose foram utilizadas, como por exemplo a técnica “OSP – Optimum Sensitivity Plate”. Por outro lado, IGARASHI et al. citados por BERGDOLL (1990) registraram a produção de enterotoxinas de cepas analisadas pelo método “RPLA – Reverse Passive Latex Agglutination”, mas que não foram detectadas pelo método “OSP”. Também foram encontradas cepas implicadas em intoxicação alimentar, sendo negativas pelo método “OSP”, mas positivas pelo método “ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (KOKAN & BERGDOLL, 1987), que é um dos métodos mais promissores, rápidos e sensíveis (ORDEN et al., 1992), com sensibilidade de 0,5 a 1,0ng/g (BERGDOLL, 1990).

Outro ensaio imunológico utilizado na detecção de enterotoxinas estafilocócicas é o método “ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay”, similar ao ELISA, determinando o resultado de forma rápida e segura (OLIVEIRA, 1999), com sensibilidade de 1,0ng/g (VERNOZY-ROZAND et al., 1998).

De acordo com uma pesquisa realizada por OLIVEIRA (1999), a técnica “RPLA”, utilizada na detecção de enterotoxinas produzidas por linhagens coagulase negativas (*S. warneri* e *S. chromogenes*), mostrou-se limitada, uma vez que, pelo método “ELFA”, em quase todas as amostras de alimentos analisadas foram detectadas a presença de algum tipo de enterotoxina produzida por *S. chromogenes*, o mesmo não ocorrendo quando da utilização do método “RPLA”.

2.2.5 – Habitat e Epidemiologia do *Staphylococcus aureus*

O homem e os animais são os principais reservatórios de *Staphylococcus aureus*. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e, a partir deste foco, atingem tanto a epiderme e feridas, bem como o ar, água, solo, leite, esgoto e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o homem (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

De maneira enfática, estudos de rastreamento epidemiológico da intoxicação estafilocócica apontam o manipulador de alimentos como elemento incisivo no processo de disseminação do microrganismo (PEREIRA et al., 1999).

A intoxicação estafilocócica é o tipo mais comum de doença transmitida por alimentos e provavelmente ocorre em muitos países do mundo, embora registros de doenças causadas por alimentos não sejam mantidos em muitos países (BERGDOLL, 1992).

Durante o período de 1975 a 1979, 540 casos de envenenamento alimentar foram registrados pelo “Center for Disease Control – CDC”, sendo o *Staphylococcus aureus* responsável por 153 casos (28%), onde os principais alimentos envolvidos continham carne vermelha, de aves ou de peixe, estando o presunto envolvido em 32% dos casos registrados (SMITH et al., 1983).

Uma das maiores intoxicações por *S. aureus*, registrada nos Estados Unidos, envolveu 1300 pessoas, em um piquenique em Indiana. Os sinais e os sintomas da doença incluíram vômito e diarreia, que ocorreram duas a três horas após a ingestão de presunto, onde um grande número de SEA foi isolado (BERGDOLL, 1992).

Intoxicação por estafilococos também pode ocorrer como resultado do consumo de embutidos fermentados, como o salame (NYCHAS & ARKOUELOS, 1990). De acordo com BERGDOLL (1992), muitas intoxicações por estafilococos ocorreram na década de 1970, devido ao consumo de salames feitos de carne crua, geralmente usando culturas iniciadoras de estafilococos e fermentados sem aquecimento.

Nos Estados Unidos, de acordo com o CDC (2000), nos anos de 1993 a 1997, foram registrados 1413 casos de intoxicações por *S. aureus*, sendo a carne bovina, suína e o presunto os principais alimentos envolvidos.

No Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que cerca de 21.000 pessoas foram internadas no ano de 1987 devido a intoxicação alimentar, sendo que 4.500 foram internações observadas em crianças menores de cinco anos. Os agentes etiológicos de maior ocorrência foram *S. aureus* e *C. perfringens*, envolvidos em 50% dos surtos investigados (GERMANO et al., 1993).

2.3 – *Clostridium botulinum*

2.3.1 – Histórico

Durante o século XVIII, na Europa Central, o botulismo era normalmente associado ao consumo de embutidos e devido a essa associação ao produto, o termo botulismo foi introduzido para designar a doença. Esse termo derivou do latim “*botulus*”, que significa embutido (DOLMAN, 1964; SMITH, 1977; HAUSCHILD, 1989).

O agente etiológico do botulismo foi isolado pela primeira vez em 1896 por van Ermengen, estudando um surto de envenenamento alimentar por presunto salgado em Ellezelles, Bélgica. Um total de 34 pessoas foram envolvidas, sendo que três morreram. O microrganismo foi isolado por van Ermengen do alimento e do baço de uma das vítimas, sendo nomeado de *Bacillus botulinus*. Essa designação permaneceu até 1923, quando foi redenominado de *Clostridium botulinum* (DOLMAN, 1964; SMITH, 1977; HAUSCHILD, 1989).

van Ermengen caracterizou o microrganismo como móvel, Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos, com um crescimento ótimo na faixa de 25 a 30°C e reconheceu a doença como uma intoxicação (HAUSCHILD, 1989).

Landmann, em 1904, isolou o *C. botulinum* de feijões enlatados que causaram um surto envolvendo 21 pessoas, das quais 11 morreram. Essa foi a primeira vez que um alimento de origem vegetal foi implicado em um surto de botulismo (HAUSCHILD, 1989).

Em 1910, Leuchs relatou que as cepas isoladas por van Ermengen e Landmann produziam, cada uma delas, neurotoxinas sorologicamente diferentes (HAUSCHILD, 1989).

Baseados nas descrições de van Ermengen, a cepa isolada do presunto salgado pôde ser classificada como uma cepa não proteolítica do tipo B e, mais tarde, outros tipos de *C. botulinum* (A-G) foram identificados (SOFOS, 1992).

De acordo com LEITÃO & DELAZARI (1983), a primeira menção sobre a ocorrência de *C. botulinum*, no Brasil, foi feita por Jeffman em 1958, descrevendo um surto de botulismo ocorrido em Porto Alegre – RS, atribuindo-o ao consumo de conserva de peixes.

Em 1943, nos Estados Unidos da América, foi reconhecido o primeiro caso de botulismo de feridas, conseqüente da formação de toxina em uma lesão infeccionada e, em 1976, foi reconhecido o botulismo infantil, devido à absorção da toxina botulínica “in vivo” no trato intestinal de crianças, geralmente com idade inferior a um ano, após a ingestão de esporos e multiplicação do *C. botulinum* no trato intestinal (CDC, 1979).

2.3.2 – Características do *Clostridium botulinum*

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

A espécie inclui sete tipos: A, B, C, D, E, F e G, diferenciados pela especificidade antigênica de suas toxinas (CATO et al., 1986). Os tipos A, B e E têm causado a maioria dos casos de botulismo em humanos, enquanto os tipos C e D são mais freqüentes em botulismo de outros mamíferos e aves (SMITH, 1977; EKLUND, 1982). O tipo F foi implicado em apenas dois surtos de botulismo no homem (HAUSCHILD, 1989) e o tipo G ainda não foi reconhecido em casos de botulismo (HAUSCHILD, 1989; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As toxinas botulínicas são designadas segundo os tipos das cepas de *C. botulinum* que as produzem, porém o tipo C é dividido em subtipos C α e C β , desde 1924. A cepa C α produz toxinas do tipo C₁, C₂ e D, e a cepa C β produz apenas toxina C₂. A cepa do tipo D produz toxinas dos tipos D, C₁ e C₂ (SMITH,

1977). Desta forma, são reconhecidos oito tipos de toxinas A, B, C₁, C₂, D, E, F e G (SUGIYAMA, 1980; HAUSCHILD, 1990).

De acordo com SOLOMON et al (1985), as cepas de *C. botulinum* são classificadas em quatro grupos:

- Grupo I – inclui todas as cepas produtoras de toxinas do tipo A e as cepas proteolíticas produtoras de toxinas B e F;
- Grupo II – inclui todas as cepas do tipo E e as cepas não proteolíticas dos tipos B e F;
- Grupo III - compreendem as cepas dos tipos C e D;
- Grupo IV – inclui todas as cepas do tipo G.

As neurotoxinas são de natureza protéica e podem apresentar peso molecular entre 150.000 a 900.000 daltons (HAUSCHILD, 1989).

O desenvolvimento do *C. botulinum* em alimentos é condicionado por vários fatores de natureza física e/ou química denominados barreiras. O controle da atividade de água, a acidez, a utilização de temperaturas elevadas de processamento, a estocagem em baixa temperatura, o uso de cloreto de sódio e de nitritos ou outros conservadores são algumas das barreiras mais utilizadas. Um nível elevado de contaminação por esporos de *C. botulinum* pode aumentar severamente a possibilidade do desenvolvimento e produção de toxina por esta bactéria (JUNQUEIRA, 1994).

De acordo com ICMSF (1996), as cepas pertencentes ao grupo I têm um crescimento ótimo entre 35 e 40°C, enquanto que as cepas do grupo II têm um ótimo entre 28 e 30°C. Segundo HAUSCHILD (1989), temperaturas de refrigeração menores ou iguais à 10°C controlam o desenvolvimento das cepas produtoras de toxinas do tipo A e B proteolítico e temperaturas menores ou iguais à 3°C, controlam o desenvolvimento das cepas do tipo E e B não proteolítico.

O desenvolvimento das cepas do grupo I é controlado por uma concentração maior ou igual a 10% de NaCl na salmoura e uma atividade de água menor ou igual a 0,94, enquanto que as cepas do grupo II são controladas por

uma concentração maior ou igual a 5,0% de NaCl na salmoura e uma atividade de água menor ou igual a 0,97 (ICMSF, 1996).

Segundo HAUSCHILD (1989), o desenvolvimento de *C. botulinum* tipos A e B proteolítico é controlado com pH menor ou igual a 4,6 e as do tipo E e B não proteolítico com pH menor ou igual a 4,8.

2.3.3 – Mecanismo de Ação das Neurotoxinas

Os sintomas da intoxicação por *Clostridium botulinum* podem aparecer em poucas horas ou após vários dias. Os primeiros sintomas são fraqueza, fadiga, tontura, seguida de visão obscura e dificuldade progressiva em falar e engolir. Enfraquecimento dos músculos do diafragma e respiratório também são observados e a morte é devida à falência respiratória. A administração imediata de antitoxinas combinadas com cuidados médicos, especialmente a manutenção artificial da respiração, tem reduzido o número de mortes (ICMSF, 1996).

A toxina botulínica atua sobre o sistema nervoso periférico ao bloquear a passagem do estímulo nervoso, inibindo a liberação de acetilcolina, causando principalmente distúrbios neuromusculares e digestivos. Náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, às vezes precedem o início dos sintomas neurológicos, porém, a constipação é comum à medida que o envolvimento neurológico progride. (CDC, 1979; SAKAGUCHI, 1979; SUGIYAMA, 1980).

A toxina do *C. botulinum* está entre as mais tóxicas de todas as substâncias que ocorrem naturalmente. Estima-se que a quantidade de toxina do tipo A necessária para causar a morte no homem varia entre 0,1 a 1,0µg (SCHANTZ & SUGIYAMA, 1974 citado pelo ICMSF, 1996).

A duração da doença é de 1 a 10 dias ou mais, dependendo do tipo, da quantidade de toxina e de alimento ingerido e da resistência da vítima (HAUSCHILD, 1989).

2.3.4 – Detecção de Neurotoxinas

O diagnóstico do botulismo de origem alimentar, é geralmente confirmado quando, além dos sintomas clínicos desta intoxicação, a toxina e/ou o *Clostridium botulinum* são detectados em amostras do alimento suspeito ou em amostras clínicas do paciente (soro sanguíneo, fezes, vômito, conteúdo gástrico, porções de intestino delgado, grosso e fígado) ou de ambos (CDC, 1979).

A detecção de toxina botulínica é geralmente realizada por ensaio biológico, através de administração intraperitoneal de amostras líquidas ou de extratos de amostras sólidas em camundongos, baseando-se na ação letal da toxina nestes animais e na sua neutralização com antitoxina específica. Esse ensaio permite detectar menos que 0,1µg de toxina (SAKAGUCHI, 1979; CDC, 1979).

Os sinais típicos de botulismo em camundongos são: pêlos eriçados, estreitamento da cintura, respiração ofegante, dificuldade de locomoção, paralisia progressiva e morte (KAUTTER E LYNT, 1984 citados por JUNQUEIRA, 1994).

2.3.5 – Habitat e Epidemiologia

Clostridium botulinum encontra-se amplamente distribuído na natureza, sendo o solo e o ambiente aquático (sedimentos) seu habitat principal, podendo contaminar os mais diferentes tipos de alimentos, tanto de origem vegetal como também de origem animal (JUNQUEIRA, 1994).

Os esporos de *C. botulinum* estão distribuídos no solo e o do tipo A é o mais freqüente no oeste dos Estados Unidos e em países como Argentina e Brasil (HAUSCHILD, 1989; SOFOS, 1992). Os do tipo B são comuns no leste dos Estados Unidos e Europa. As cepas americanas são predominantemente do tipo proteolítico (grupo I) e as da Europa do tipo não proteolítico (grupo II). O tipo E é prevalente no ambiente aquático, sendo comum no Japão, na Suécia e na antiga União Soviética (HAUSCHILD, 1989).

Os pescados aparecem freqüentemente associados ao tipo E. Os vegetais são associados ao tipo A, enquanto que o tipo B é predominante em produtos cárneos (HAUSCHILD, 1989).

Segundo INSALATA et al. (1969), em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos, foi observada uma amostra positiva para *C. botulinum* tipo B em salsicha entre 70 amostras de produtos cárneos embalados a vácuo, porém, o peso total das amostras examinadas não foi relatado. De acordo com SOFOS et al. (1979), a incidência de esporos de *C. botulinum* em carnes frescas e em produtos cárneos, de acordo com as escassas pesquisas relatadas, especialmente nos Estados Unidos, Canadá e Grã-Bretanha, é relativamente baixa. Porém, com o aprimoramento da metodologia, e o aumento do peso de cada amostra, uma incidência mais elevada pode ser esperada.

De acordo com os dados do CDC (2000), Nos Estados Unidos, nos anos de 1993 a 1997, foram registrados 56 casos de intoxicações por *C. botulinum*, sendo um deles fatal.

O Instituto Adolfo Lutz em São Paulo recebeu entre 1982 e 1997, 37 amostras suspeitas de causar botulismo alimentar, entre alimentos e materiais biológicos de pacientes acometidos, provenientes dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Acre. Dessas, 11 (29,7%) foram positivas no ensaio biológico em camundongos, sendo quatro de origem alimentar e sete de materiais biológicos. Entre as amostras soro-positivas para toxina botulínica, verificou-se que os alimentos envolvidos eram conservas caseiras de carne de porco e de piqui (GELLI & JAKABI, citado por LARA et al., 1999)

Devido à presença de *C. botulinum* no ambiente, LARA et al. (1999), alertam para ocorrência de casos esporádicos de botulismo humano no Brasil. Apesar de já existirem há algum tempo, processos tecnológicos que permitam a eliminação de riscos da intoxicação botulínica para a população, os surtos continuam ocorrendo, provavelmente relacionados ao processamento tecnológico inadequado, à ausência de higiene na fabricação ou ainda às alterações particulares e regionais na composição original dos produtos.

2.4 – Conservação da Carne

A carne é um alimento altamente perecível que, se não for corretamente armazenado, processado, embalado e distribuído, rapidamente se deteriora e torna-se perigoso devido ao crescimento microbiano (McDONALD & SUN, 1999). Portanto, recomenda-se a utilização de uma carne com boas qualidades microbiológicas para a elaboração de um produto cárneo, visto que, se já houver crescimento de microrganismos, o produto resultante apresentará sabor e odor desagradáveis (FRAZIER & WESTHOFF, 1993).

Dos diversos procedimentos empregados para retardar ou, quando possível, inibir o crescimento microbiano, a refrigeração constitui o método mais utilizado, permitindo aumentar a vida-de-prateleira da carne sem, contudo, provocar modificações no produto (GARCIA et al., 1995; ELLIOTT, 1996; GILL, 1996).

Um dos procedimentos, que podem ser utilizados conjuntamente com a refrigeração, para aumentar a vida-de-prateleira da carne e garantir a sua qualidade sanitária, é o da embalagem em atmosfera modificada (GÁRCIA de FERNANDO et al., 1995). A embalagem a vácuo pode ser considerada como um tipo de atmosfera modificada, visto que, nessas condições, o oxigênio residual é consumido rapidamente, devido ao crescimento microbiano e à respiração muscular, alcançando-se no final de um ou dois dias, níveis de dióxido de carbono na ordem de 20 a 30% (GARCIA et al., 1995).

Em condições anaeróbias, sob elevados níveis de dióxido de carbono, a microbiota aeróbia é inibida e a instauração de uma microbiota lática, de crescimento mais lento é estimulada (LEISNER et al., 1995). Nas carnes embaladas a vácuo a microbiota lática predominante é formada por *Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp. e *Carnobacterium* spp (GARCIA et al., 1995; FRANCO & LANDGRAF, 1996). O termo bactérias láticas é empregado para caracterizar um elevado número de bactérias Gram-positivas, cuja característica comum é a produção de ácido lático a partir de carboidratos. Segundo LEU et al. (1987), a obtenção de uma microbiota dominada por bactérias láticas, principalmente

Lactobacillus spp. e *Leuconostoc* spp., pode ser viabilizada pelo armazenamento da carne embalada a vácuo em temperaturas de refrigeração. GRIFFIN et al. (1982), verificaram que a carne embalada a vácuo poderia ser mantida sob refrigeração a 2°C, por até 24 dias, sem prejuízos para as suas qualidades sensoriais.

De acordo com GARCIA et al. (1995), a maior parte dos trabalhos relacionados com a microbiologia da carne e dos produtos cárneos embalados em atmosferas modificadas tem apresentado um aumento na vida-de-prateleira destes produtos, mas muitos pesquisadores têm demonstrado preocupação pela possibilidade de que esta prática possa representar um perigo para a saúde dos consumidores, devido à possibilidade de supressão da microbiota deterioradora favorecendo o crescimento e a produção de toxinas por alguns microrganismos patogênicos.

Entre os microrganismos patogênicos capazes de se desenvolver em carnes embaladas a vácuo, que merecem maior atenção por parte dos pesquisadores, destacam-se as cepas não proteolíticas de *Clostridium botulinum*, que podem crescer em temperaturas por volta de 3,3°C e produzir neurotoxinas, sem que a carne apresente sinais evidentes de deterioração (SPERBER, 1982).

O *Staphylococcus aureus* pode ser encontrado em carnes embaladas a vácuo, porém o seu crescimento e a sua capacidade de produzir enterotoxinas são inibidos pelas baixas concentrações de oxigênio, sendo sensível à presença de uma microbiota competitiva e à acidez do meio. (BOURGEOIS et al., 1994).

GARCIA et al., (1995) advertem que microrganismos patogênicos como *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes* podem proliferar em carnes embaladas a vácuo e tornando-a um veículo de contaminação alimentar; no entanto, estes patógenos são inibidos pela presença de bactérias lácticas.

De acordo com ICMSF (1980), a embalagem a vácuo estimula o desenvolvimento das bactérias lácticas, que produzem ácidos orgânicos, provocando a redução do pH que, por sua vez, retarda o crescimento de bactérias aeróbias, responsáveis pela deterioração da carne fresca. A redução do pH

suprime também o crescimento de bactérias patogênicas como *Clostridium botulinum*.

Segundo SILLIKER & WOLFE (1980), a eficiência da embalagem a vácuo sobre o controle do desenvolvimento microbiano diminui quando a temperatura de armazenamento supera a faixa considerada adequada para refrigeração (0 - 4°C). Conseqüentemente, quando a carne é mantida em temperaturas compreendidas entre 5 e 12°C, proliferam microrganismos patogênicos como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Segundo STILES & HASTINGS (1991), as bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas, que se desenvolvem nas carnes embaladas a vácuo, armazenadas sob temperaturas adequadas, são capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e deterioradores Gram-positivos, aumentando, portanto, a sanidade e a vida-de-prateleira da carne. Porém, se essas condições não forem rigorosamente controladas, poderão se desenvolver *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* e *Staphylococcus aureus*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – MATERIAL

3.1.1 – Matéria-prima

- Coxão mole bovino, sem osso, composto pelos músculos *semimembranosus* e *adductor femoris*, sem a capa do coxão (*m. gracilis*), refrigerado e embalado a vácuo, procedente do Frigorífico GJ, Promissão – SP.

3.1.2 – Microrganismos

- *Clostridium botulinum* tipo A, ATCC 25763, fornecido pelo “Center for Disease Control (CDC)”- Atlanta, GA, USA.
- *Clostridium botulinum* tipo B proteolítico, ATCC 7949, fornecido pelo “Center for Disease Control (CDC)”- Atlanta, GA, USA.
- *Clostridium botulinum* tipo E, ATCC 9564, fornecido pelo “Center for Disease Control (CDC)”- Atlanta, GA, USA.
- *Staphylococcus aureus* S6, fornecido pelo prof. Dr. Merlin S. Bergdoll, do Food Research Institute (FRI) – University of Wisconsin, Madison, USA.

3.1.3 – Meios de Culturas

- Ágar APT (Difco);
- Ágar Baird-Parker – BP (Difco), suplementado com solução aquosa de telurito de potássio (Riedel-de Haën) e emulsão gema de ovo : salina (1:1 peso/peso);
- Ágar Base Perfringens, (Difco) suplementado com cicloserina (Oxoid);
- Ágar Bismuto Sulfito – BS (Merck);
- Ágar Entérico de Hectoen – HE (Difco);

- Ágar Padrão para Contagem – PCA (Difco), suplementado com cloranfenicol (Oxoid);
- Ágar Padrão para Contagem – PCA (Difco);
- Ágar Trypticase de Soja – TSA (Oxoid)
- Ágar Vermelho Violeta Bile - VRBA (Merck);
- Ágar Xilose Lisina Desoxicolato – XLD (Difco);
- Água Peptonada Tamponada – BPW (Difco);
- Caldo Infusão Cérebro Coração – BHI (Difco);
- Extrato de levedura (Difco);
- Peptona (Difco);
- Triptona (Difco).

3.1.4 – Equipamentos

- Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J2-21;
- Centrífuga refrigerada Sorval Instruments, modelo RC5 C;
- Equipamento para detecção de toxinas, bioMérieux, Mini-Vidas;
- Equipamento para determinação de permeabilidade à gases em filmes plásticos, Modern Controls Inc, modelo OX-TRAN 2/20;
- Estufas incubadoras para BOD;
- Homogeneizador de pistões, “Stomacher”, Seward Medical, modelo Lab-Blender 400;
- Medidor de atividade de água, Decagon, modelo AquaLab CX-2;
- Medidor/Registrador, programável de temperatura e umidade relativa (*data logger*) – Testo, modelos 171-2, 171-4, 650;
- Potenciômetro medidor de íons, pH e potencial de óxido-redução, Mettler Toledo, modelo MA 130;
- Potenciômetro medidor de pH e de potencial de óxido-redução, Mettler Toledo, modelo MA 125;
- Programa e interface para transferência e análise dos dados obtidos com os registradores Testo, *Comfort software “Professional”*.

3.1.5 – Outros

- Antitoxinas de *Clostridium botulinum* (tipos A, B e E), fornecidos pelo “Center for Disease Control”- Atlanta, GA, USA;
- Camundongos tipo “Swiss” (*Mus musculus*), fêmeas, pesando aproximadamente 20g, fornecidos pelo Biotério Central - UNICAMP;
- Filme plástico de poliéster, fornecido pelo CETEA - ITAL;
- Kit Vidas para detecção de enterotoxinas de estafilococos, bioMérieux;
- Papel indicador de pH, Merck;
- Sacos plásticos termoencolhíveis para embalagem a vácuo, de alta barreira ao oxigênio ($9,6\text{ccO}_2/\text{m}^2/\text{dia}$), Viskase, Perflex Clear TiteTM 62 (Embalagem A);
- Sacos plásticos para embalagem a vácuo, de baixa barreira ($40,0\text{ ccO}_2/\text{m}^2/\text{dia}$), Intervac, Nylon/Poli (Embalagem B);
- Sal grosso iodado, Cisne;
- Vedante de silicone, Flexite, ALBA;

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Processamento

Na **Figura 1** é apresentado um fluxograma do processamento da carne salgada e levemente dessecada.

Para a realização do processamento, foram utilizadas 20 peças de coxão mole (*m. semimembranosus* e *m. adductor femoris*) sem a sua capa (*m. gracilis*). Cada peça foi numerada de 1 a 20, pesada, o exsudado drenado e retiradas as aparas de gordura.

As peças de coxão-mole foram cortadas em quatro fatias e numeradas de um a quatro. O corte das fatias foi feito paralelamente aos feixes de fibras, com espessura de 5,0cm (**Figura 2**). Cada fatia recebeu uma etiqueta plastificada contendo o número do coxão e o número da fatia correspondente.

As fatias foram pesadas e salgadas a seco com 4% de sal (70% de sal grosso e 30% de sal fino). A granulometria do sal grosso era de 1,0 a 0,75mm e do sal fino menor que 0,75mm. O sal foi espalhado (**Figura 3**) e esfregado manualmente por toda a superfície da carne.



Figura 2. Preparo da matéria-prima.



Figura 3. Processo de salga.

Após a salga, as fatias foram colocadas em caixas plásticas e deixadas em descanso por quatro horas (viradas após duas horas) a uma temperatura de 0°C, e em seguida, foram levemente dessecadas em câmara climatizada por quatro

horas a uma temperatura média de 24,5°C e umidade relativa do ar de 52,3% (Figura 4).



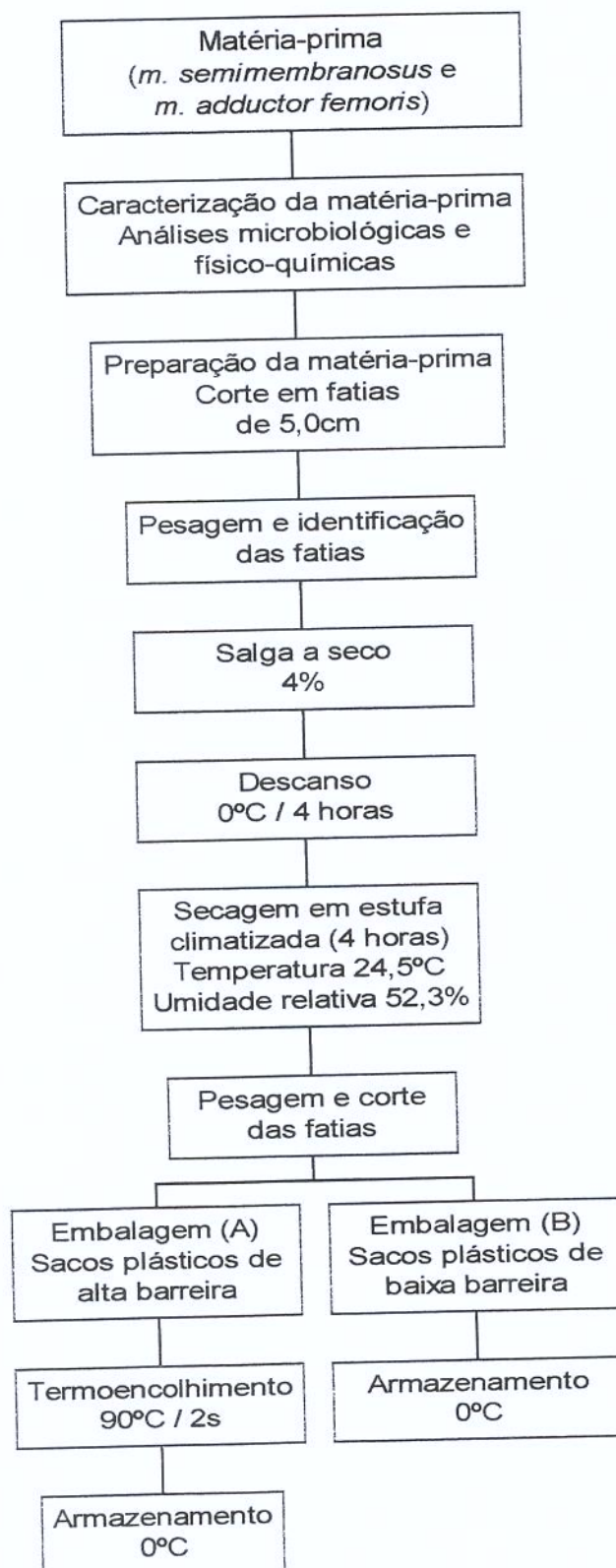
Figura 4. Processo de secagem em câmara climatizada.

Todas as etapas de preparação da matéria-prima até a salga das fatias foram realizadas em sala de desossa climatizada a 14°C, do Laboratório de Carnes - FEA, tomando-se todos os cuidados higiênico-sanitários.

Após a secagem na câmara climatizada, cada fatia foi pesada, cortada em três ou quatro pedaços (Figura 5), divididas aleatoriamente em dois grupos, através do gerador de números aleatórios do Excel®, para, em seguida, serem embaladas a vácuo em sacos de alta ou de baixa barreira.



Figura 5. Carne salgada e levemente dessecada.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Figura 1. Fluxograma do processamento da carne bovina salgada e levemente dessecada.

3.2.2 – Embalagem

As amostras foram embaladas a vácuo em embalagens de alta barreira (Embalagem A) ou de baixa barreira (Embalagem B). As análises de permeabilidade ao oxigênio das embalagens foram realizadas com o equipamento OX-TRAN 2/20, do Laboratório de Embalagens – FEA, e os resultados são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Permeabilidade ao oxigênio das embalagens A e B.

Embalagem	Permeabilidade
A	9,6 ccO ₂ /m ² /dia
B	40,0 ccO ₂ /m ² /dia

As amostras acondicionadas na embalagem A sofreram um processo de termoencolhimento em banho-maria a 90°C por dois segundos.

O produto, após embalado, foi armazenado a uma temperatura de 0°C por 24 horas e, em seguida, foi inoculado com uma cepa de *Staphylococcus aureus* S6 ou com esporos de *Clostridium botulinum* tipos A, B e E. As amostras reservadas para as análises físico-químicas ficaram armazenadas a 0°C por 24 horas, enquanto que as amostras para as análises microbiológicas ficaram armazenadas a 0°C por 96 horas.

3.2.3 – Preparação dos Inóculos

3.2.3.1 - *Staphylococcus aureus* S6

A cepa de *Staphylococcus aureus* S6, apresentava-se liofilizada em pérolas de porcelana e sua ativação foi realizada introduzindo-se uma dessas pérolas em um tubo de ensaio contendo 5mL de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e

incubando a 37°C por 24 a 48 horas. Após crescimento, uma alçada do inóculo foi repassada para um Erlenmeyer contendo 50mL do mesmo meio que foi incubado sob agitação de 150rpm a 37°C por 24 a 48 horas. A partir desta cultura, um inóculo de 10^5 UFC/mL foi padronizado de acordo com a tabela de McFarland.

3.2.3.2 - Clostridium botulinum

Para preparação da suspensão de esporos de *C. botulinum* tipos A, B e E, foi usada a técnica de inoculação em superfície de placas de Petri, contendo o meio Trypticase Peptona Extrato de Levedura (TPGY), formulado de acordo com FDA (1984), adicionado de 2% de ágar. Após cultivo em anaerobiose a 30°C durante três dias, as placas foram mantidas em temperatura ambiente durante mais sete dias e as colônias removidas por enxágue com água destilada estéril. Esta suspensão foi lavada por centrifugação conforme descrito em HAUSCHILD et al. (1975). A suspensão obtida foi submetida à microscopia de contraste de fase para observação de esporos refringentes e à contagem em placas por inoculação em profundidade, utilizando o meio TPGY adicionado de púrpura de bromocresol, gema de ovo e 2% de ágar, com sobrecamada de ágar com ditioneitol e incubação anaeróbia a 30°C durante 48 horas (JUNQUEIRA & LEITÃO, 1997).

Antes da inoculação, preparavam-se as suspensões de esporos ("pool") de *C. botulinum* tipos A, B e E, que eram mantidas a 4°C e misturados em partes iguais, perfazendo aproximadamente 10^3 esporos/mL.

3.2.4 – Inoculação

Após processada e embalada a vácuo, as amostras ficaram estocadas a 0°C por 24 horas, para em seguida serem inoculadas.

Para cada tipo de embalagem estudada, 33 amostras de carne salgada e levemente dessecada foram inoculadas com *S. aureus* S6 e 48 amostras com esporos de *C. botulinum* tipos A, B e E.

A inoculação foi realizada no centro da embalagem, através de um septo de silicone, sem perda de vácuo (**Figura 6**).

Os septos foram confeccionados utilizando-se uma bisnaga de vedante de silicone comercial, de base acética. O suporte para a confecção dos septos consistiu de uma folha de filme de poliéster com dimensões aproximadas de 40 x 40 cm, sobre a qual foi colada uma fita adesiva de dupla face em fileiras separadas de 1 cm entre si. Após a aplicação da fita adesiva o filme plástico foi virado de modo a permitir a moldagem dos septos sobre o filme de poliéster. Os septos foram, então, moldados acompanhando a região central da fita dupla face, com um volume de adesivo de aproximadamente 1cm de diâmetro por 1cm de altura, obedecendo-se uma distância de um septo a outro de 5 cm e deixados secar por 48 a 72 horas a temperatura ambiente.



Figura 6 – Septo de silicone colado na região central da embalagem.

3.2.4.1.- Staphylococcus aureus

As amostras foram inoculadas na região central e superficial do produto, com 0,2mL de suspensão de *S. aureus* S6. A inoculação foi realizada através do septo de silicone, com uma seringa descartável de 1mL e agulha de 1cm de comprimento estéreis.

Imediatamente após a inoculação, utilizando-se de uma caneta de retroprojektor, fez-se a demarcação da área de espalhamento do inóculo na superfície da amostra.

3.2.4.2.- *Clostridium botulinum*

As amostras foram inoculadas na região central e interna do produto, com 0,1mL de suspensão de *C. botulinum* tipos A, B e E. A inoculação foi realizada através do septo de silicone, com uma seringa descartável de 5mL e agulha de 3cm de comprimento.

3.2.5 – Estocagem

Após a inoculação com *Staphylococcus aureus* S6 ou com esporos de *Clostridium botulinum* tipos A, B e E, as amostras foram estocadas nas condições apresentadas na **Tabela 2**.

Amostras não inoculadas, denominadas de controle, também foram estocadas até o último dia de incubação de cada temperatura estudada.

Tabela 2 - Temperaturas e tempos de estocagem das amostras inoculadas com *Staphylococcus aureus* ou com esporos de *Clostridium botulinum*.

Temperatura De estocagem (°C)	Tempo de estocagem (dias)	
	<i>S. aureus</i> S6	<i>C. botulinum</i> tipos A, B e E
30	1, 2 e 3	2, 5, 6, 7, 8 e 10
22	2, 4, 6 e 8	6, 9, 12 e 15
10	7, 14, 21 e 28	14, 21, e 35
4	-	30, 45 e 60

3.2.6 - Detecção de Toxinas

Para cada tipo de embalagem, tempo e temperatura de estocagem estudados, três amostras de carne salgada e levemente dessecada, foram analisadas quanto a presença de toxinas de *S. aureus* ou de *C. botulinum*.

As amostras não inoculadas (controle), foram analisadas somente no último dia de estocagem para cada temperatura estudada.

3.2.6.1 - *Staphylococcus aureus*

Amostragem e obtenção do extrato

A detecção de enterotoxinas de *S. aureus* S6 foi realizada em equipamento Mini-Vidas (bioMérieux), do Laboratório de Toxinas Microbianas, da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA. Na **Figura 7** é apresentado um fluxograma do processo de amostragem e preparação do extrato para detecção de enterotoxinas de *S. aureus*.

Com o objetivo de otimizar a amostragem, a coleta de material para obtenção do extrato restringiu-se à parte superficial da região inoculada, delimitada com a caneta de retroprojektor durante a inoculação do *S. aureus*. O material coletado, com o auxílio de um bisturi, foi transferido para um saco de “Stomacher” adicionado, na proporção de 1:1 (p/v), de tampão de extração (TRIS 2,5mol/l; Tween 10g/l e Azida Sódica 10 g/l).

O extrato foi preparado macerando-se a amostra e o tampão com um cilindro de aço de 5cm de diâmetro e 15 cm de comprimento. Para manter a amostra banhada pelo tampão, durante a maceração de pequenos volumes, os sacos de “Stomacher” foram divididos e selados ao meio, diminuindo, assim, o espaço para o espalhamento do tampão.

Após a maceração, a amostra e o tampão foram homogeneizados por dois minutos no “Stomacher”.

Aproximadamente 2mL da parte líquida do homogeneizado foi transferida para um tubo de centrifuga - Vida-set, dotado de filtro, e procedeu-se à centrifugação a 1.200 x g por 15 minutos. Após a centrifugação, os tubos foram congelados e estocados a uma temperatura de -20 a -25°C, até a execução do teste de detecção de toxinas de *S. aureus*.

Após a maceração, um grande número de amostras não apresentava uma porção líquida suficiente que pudesse ser transferida para os tubos de centrifuga. Nesses casos, os sacos de "Stomacher", contendo a amostra foram colocados em banho-maria a 80°C por dois minutos. Essa desnaturação térmica permitia a separação da porção líquida e inativação da fosfatase. Em seguida, a parte líquida era transferida para tubo Vida-set e centrifugada, conforme descrito anteriormente.

A detecção das toxinas requer que o pH do substrato esteja entre 6,0 e 8,0, portanto, após a descongelação dos substratos, fazia-se a medição do pH, utilizando-se papel indicador e, se necessário, este era ajustado através da adição de uma gota de HCl 1% seguida de nova medida do pH.

Devido à presença de fosfatases endógenas na carne, foi necessário inativar essa enzima através da incubação do substrato em banho-maria a 80°C por dois minutos.

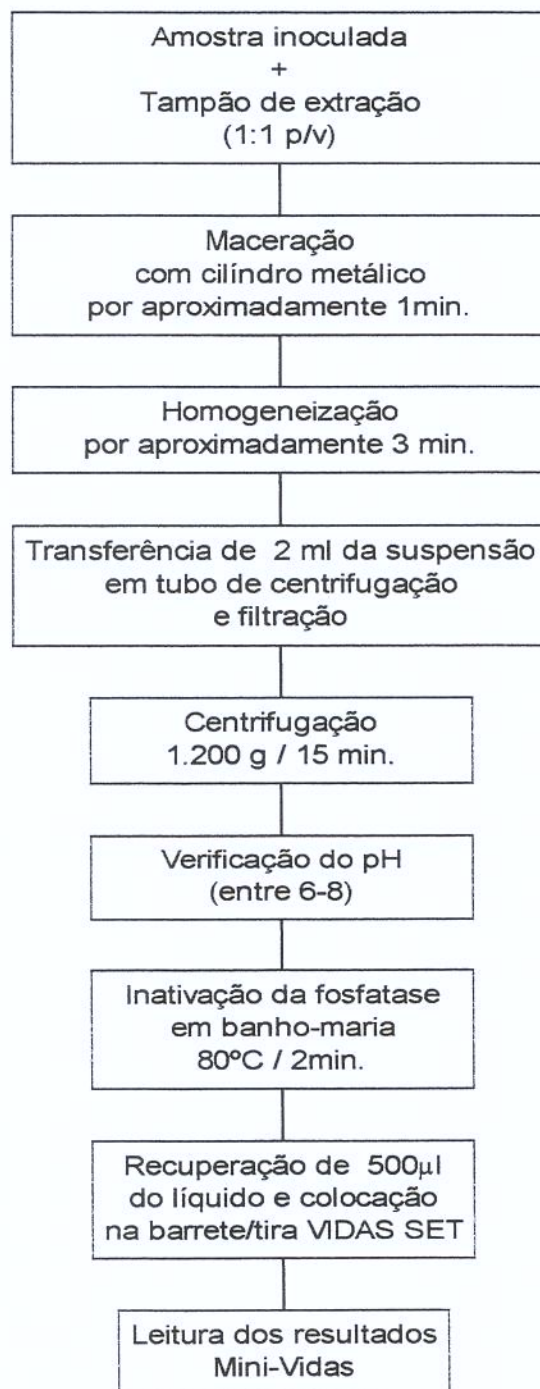


Figura 7. Fluxograma das etapas de amostragem e obtenção do extrato para detecção de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*.

Leitura dos Resultados

O equipamento Mini-Vidas efetua, automaticamente, todas as operações que vão da reação até a obtenção do resultado final, como por exemplo: pipetagens, lavagens, incubações, leituras e cálculos.

De acordo com o manual do equipamento, o Sistema Vidas alia a automatização de diferentes testes unitários executados simultaneamente com a metodologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), possibilitando resultados rápidos, seguros, sensíveis e específicos nas áreas de detecção de antígenos e toxinas bacterianas.

O ELFA é um ensaio similar ao ELISA (Enzyme Linked Imunno Assay), apresentando como diferença o substrato 4 Metil Umbeliferil Fosfato (4 MUP), que após ser hidrolisado pela enzima fosfatase alcalina, se transforma em umbeliferona, emitindo fluorescência a 450nm, quando excitada a 370nm. A intensidade de fluorescência liberada é medida e determina o resultado. Os testes tornam-se mais sensíveis, uma vez que a mínima formação do hidrolizado produz sinais de fluorescência detectáveis (Manual Mini-Vidas).

O equipamento apresenta-se dividido em dois compartimentos independentes, cada um com seis canais, possibilitando a execução simultânea de até 12 testes.

As câmaras de reação são compostas por ponteiros cônicos seladas, contendo adsorvido o anticorpo de captura e um cartucho composto por nove compartimentos (**Figura 8**), onde estão presentes os demais reagentes utilizados na reação, tampão de lavagem, conjugado constituído por anticorpos marcados com fosfatase e substrato.

Na **Figura 9** é apresentado um esquema do método ELFA. Para a realização da leitura dos resultados, uma alíquota de 500 μ L da amostra é colocada no primeiro compartimento do cartucho, a ponteira imerge automaticamente na amostra, que é aspirada e refluída várias vezes, permitindo que ocorra a reação entre o antígeno solúvel na amostra e o anticorpo adsorvido na ponteira, formando o complexo antígeno-anticorpo. O cartucho desloca-se

horizontalmente para a próxima etapa, onde uma série de lavagens elimina os componentes não fixados.

Na etapa seguinte, os anticorpos conjugados marcados com fosfatase alcalina são aspirados do cartucho e vão fixar-se às enterotoxinas estafilocócicas já fixadas aos anticorpos da parede do cone. A próxima etapa de lavagem elimina os conjugados não fixados.

Na etapa final, o substrato 4MUP é aspirado e rejeitado pelo cone. A enzima fosfatase alcalina é responsável pela revelação da reação. O 4 MUP, em presença da enzima fosfatase alcalina, sofre hidrólise e transforma-se em umbeliferona. O produto final da reação é devolvido ao compartimento de leitura, sofrendo uma excitação a 370nm, emitindo uma fluorescência de 450nm, cuja intensidade é captada por um sensor. O RFV (Valor Relativo de Fluorescência) é calculado e convertido pelo computador em resultado final do teste.

Esse teste tem sensibilidade de 1ng/g (VERNOZY-ROZAND et al., 1998) e trata-se, no entanto, de um método qualitativo, em que os resultados são interpretados como positivos ou negativos.

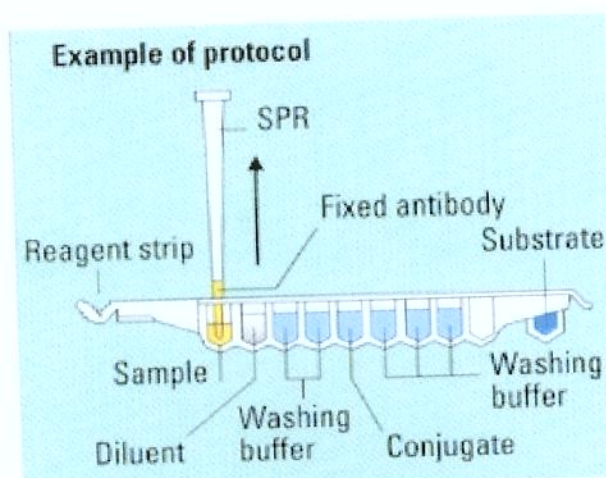


Figura 8 – Cartucho contendo os reagentes de reação.

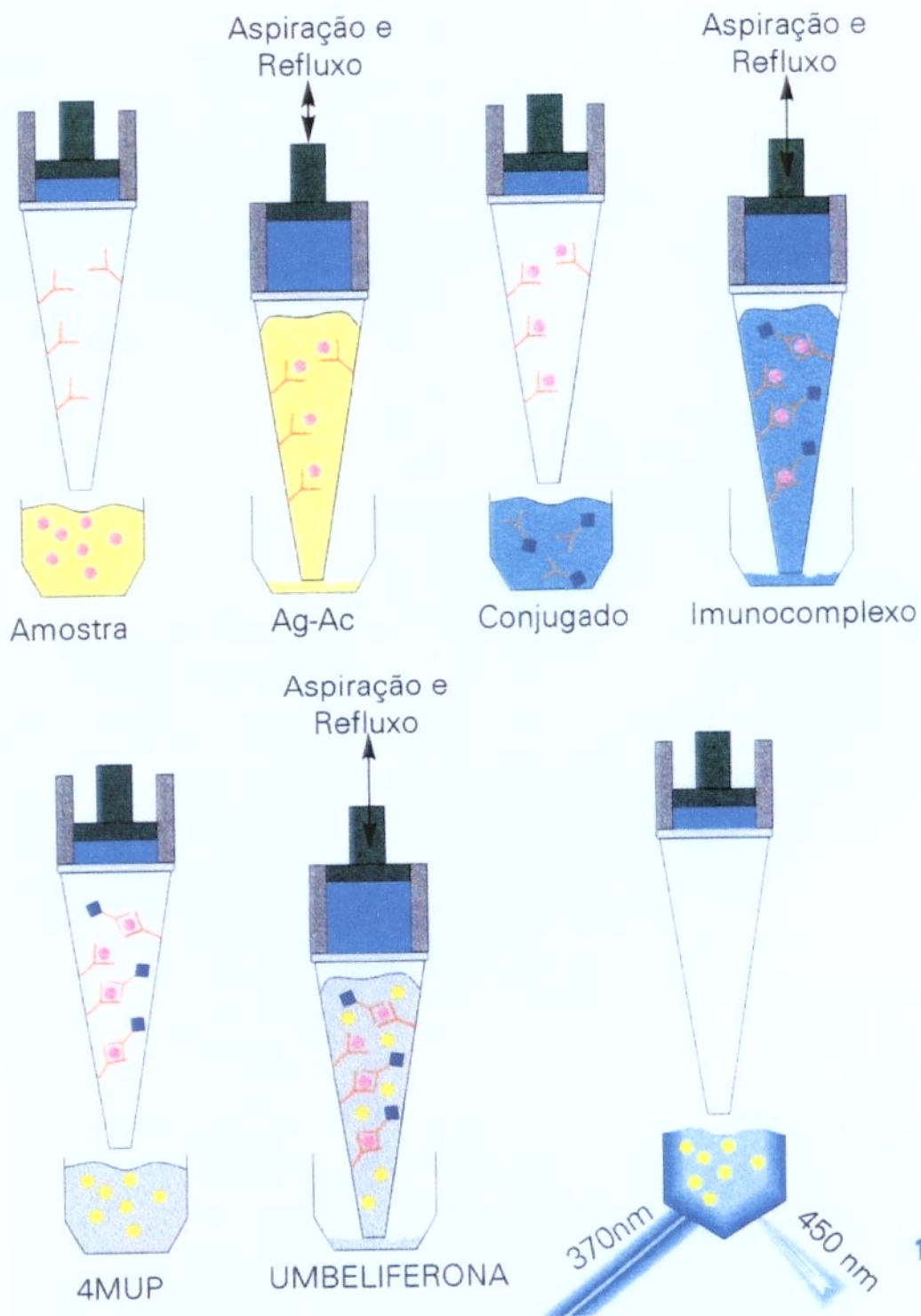


Figura 9 – Esquema do Método ELFA.

3.2.6.2 - *Clostridium botulinum*

A detecção de toxina botulínica foi realizada por meio de ensaio biológico em camundongos. Este teste baseia-se na ação letal da toxina em camundongos e na sua neutralização com antitoxina específica e permite detectar menos que 0,1 micrograma de toxina (SAKAGUCHI, 1979). Os camundongos utilizados foram fêmeas do tipo "Swiss", pesando de 20-30g, conforme CDC (1979).

Na **Figura 10** é apresentado um fluxograma do processo de amostragem e preparação do extrato para detecção de toxina botulínica.

Os extratos foram preparados macerando-se 25g de amostra do produto, retirado da região inoculada, com 25mL de solução tampão fosfato-gelatina pH 6,6, por aproximadamente um minuto. Em seguida, o líquido foi centrifugado a 12.000 x g, durante 20 minutos a 4°C. Uma alíquota de 0,4mL do sobrenadante foi inoculada em dois camundongos através de injeção intraperitoneal, e os animais postos em observação por um período máximo de quatro dias, visando observar sintomas de botulismo. O restante do sobrenadante foi congelado.

Os resultados foram considerados presuntivamente positivos, quando houve morte de pelo menos um dos dois camundongos inoculados.

A partir das amostras presuntivamente positivas foram realizadas provas confirmativas do tipo de toxina botulínica presente. Em uma alíquota de 1,0mL do sobrenadante presuntivamente positivo foi adicionado 0,25mL de antitoxina monovalente do tipo A. Após incubação a 35°C por 30 min, uma alíquota de 0,5mL do sobrenadante tratado com a antitoxina foi injetado em dois camundongos. O mesmo procedimento foi repetido para as antitoxinas monovalentes dos tipos B e E, que foram inoculadas em outros dois pares de camundongos.

A identificação do tipo de *Clostridium botulinum* foi conseguida quando houve sobrevivência do par de camundongos que foi injetado com sobrenadante neutralizado com uma das antitoxinas monovalentes e morte de todos os demais.

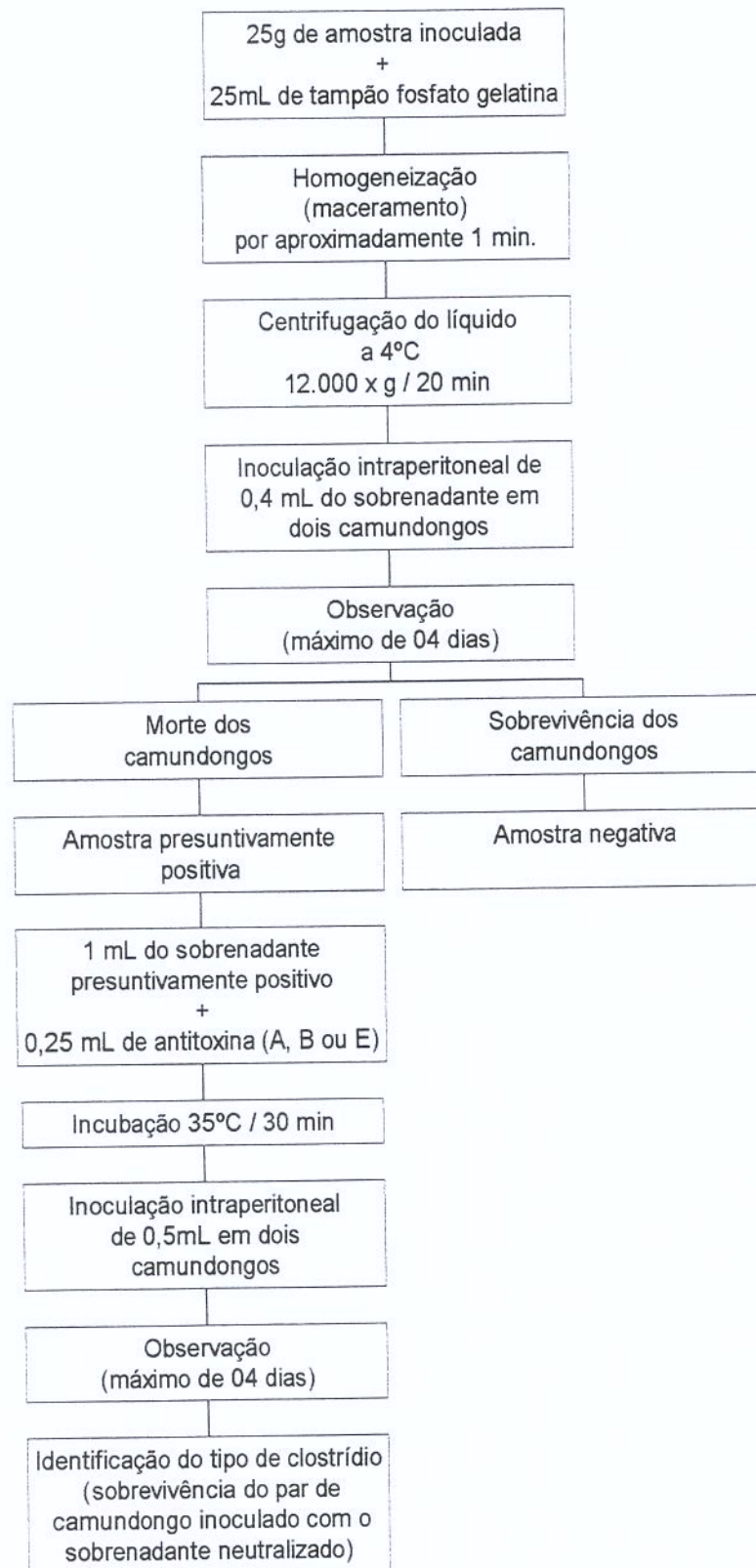


Figura 10. Fluxograma das etapas de amostragem e obtenção do extrato para detecção de toxinas de *Clostridium botulinum*.

3.2.7 - Análises Microbiológicas

3.2.7.1 - Matéria-prima

Após o processo de retirada das aparas de gordura da matéria-prima, foram coletadas de oito coxões, escolhidos aleatoriamente, amostras das partes laterais, que sobraram após o corte das fatias. Essas amostras foram acondicionadas, individualmente, em sacos de polietileno, identificadas e levadas ao Laboratório de Higiene e Legislação - FEA, para a realização das análises microbiológicas.

A amostragem foi realizada assepticamente, em capela de fluxo laminar vertical, utilizando-se tesoura e bisturi, retirando-se pouco mais de 50g de amostra.

Para realização da análise de detecção de *Salmonella* sp., 25 g da amostra obtida na capela, foram transferidas para sacos de "Stomacher" e adicionados de 225mL de água peptonada tamponada, procedendo-se, então, à homogeneização, durante dois minutos em homogeneizador de pistões "Stomacher" e incubação à 30°C por 24 horas, seguindo a metodologia descrita por VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992).

Outras 25g de amostra foram adicionadas de 225mL de água peptonada 0,1% e homogeneizadas em homogeneizador de pistões "Stomacher", durante dois minutos. Em seguida, foram feitas as diluições decimais seriadas para a realização das seguintes análises microbiológicas:

- Contagem de bactérias lácticas;
- Contagem de clostrídios sulfito redutores;
- Contagem de enterobactérias;
- Contagem de *Staphylococcus aureus*;
- Contagem total de bolores e leveduras;
- Contagem total de psicrotróficos.

Todas as análises, incluindo a detecção de *Salmonella* sp., seguiram as recomendações de VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992), exceto a de enterobactérias que foi de acordo com ICMSF (1978).

3.2.7.2 - Produto

As análises microbiológicas foram realizadas em oito amostras de carne salgada e levemente dessecada, embaladas a vácuo, após 96 horas de estocagem a 0°C. Os procedimentos de amostragem e as análises foram os mesmos descritos para a matéria-prima.

3.2.8 – Análises Físico-Químicas

3.2.8.1 - Determinação do pH

Matéria-prima

A determinação do pH foi realizada em todas as amostras da matéria-prima, homogeneizando-se 10g de músculo com 3,0mL de água destilada. A leitura do pH foi realizada em pHmetro portátil, previamente calibrado com solução tampão pH 7,0 e 4,0, utilizando-se eletrodo de penetração.

Produto

A determinação do pH no produto embalado a vácuo, foi realizada através de medição direta em pHmetro portátil calibrado com solução tampão pH 7,0 e 4,0. A medição do pH foi realizada na parte superficial e interna do produto, em três posições, utilizando-se eletrodos de superfície e de penetração. A medida de pH do produto foi realizada 24 horas após o processamento e durante os mesmos períodos de estocagem das amostras inoculadas (**Tabela 2**).

3.2.8.2 - Determinação do Potencial de Óxido-Redução

A determinação do potencial de óxido-redução foi realizada apenas nas amostras de carne salgada e levemente dessecada, embaladas a vácuo, através de medição direta em potenciômetro portátil, aferido com solução redox (220mV) e utilizando-se eletrodo de platina. A medição foi realizada imediatamente após a abertura da embalagem, através de um corte vertical realizado na parte central da embalagem e do produto, facilitando a introdução do eletrodo. A medição foi realizada em apenas um ponto, devido à falta de repetibilidade dos resultados após a abertura da embalagem. A medida do potencial de óxido-redução foi realizada 24 horas após o processamento e durante os mesmos períodos de estocagem das amostras inoculadas (**Tabela 2**).

3.2.8.3 - Determinação da Atividade de Água

A determinação da atividade de água foi realizada nas amostras de carne salgada e levemente dessecada, embaladas a vácuo, através de medição direta no aparelho de atividade de água AquaLab, calibrado com soluções de KCl, K₂SO₄ e água destilada.

Amostras em triplicatas, da parte superficial e interna do produto, foram cortadas e colocadas em cápsulas de plásticos que foram inseridas diretamente dentro do aparelho. A atividade de água do produto foi realizada 24 horas após o processamento e durante os mesmos períodos de estocagem das amostras inoculadas (**Tabela 2**).

3.2.8.4 - Determinação de Umidade, Proteína, Cinzas e Cloreto de Sódio

Os métodos utilizados foram descritos por HORWITZ (1980). Essas análises foram realizadas em triplicatas, utilizando-se oito amostras de matéria-prima e de produto, 24 horas após o processamento.

3.2.8.5 - Determinação de Lipídios

O método utilizado foi descrito por BLIGH & DYER (1959). Essa análise foi realizada em triplicata, utilizando-se oito amostras de matéria-prima e de produto, 24 horas após o processamento.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela 3** são apresentados os resultados das análises de composição centesimal, inclusive cloreto de sódio, na matéria prima e no produto. Observa-se que houve uma redução no teor de umidade da matéria prima para o produto de 4,4 pontos percentuais, um pequeno aumento na proteína e um grande aumento na porcentagem de cinzas, refletindo o processo de salga que resultou em aproximadamente 2,9% de sal no produto.

Tabela 3 – Teores de umidade, proteína, lipídios, cinzas e cloreto de sódio na matéria prima e no produto.

Análise (%)	Média $\pm$ DP ^a	
	Matéria Prima	Produto
Umidade	74,2 $\pm$ 0,98	69,8 $\pm$ 0,68
Proteína	22,8 $\pm$ 1,11	24,5 $\pm$ 0,49
Lipídios	2,2 $\pm$ 0,51	2,3 $\pm$ 0,61
Cinzas	1,08 $\pm$ 0,03	3,60 $\pm$ 0,42
Cloreto de sódio	0,02 $\pm$ 0,002	2,90 $\pm$ 0,320

^a Médias e desvios-padrão de triplicatas de oito amostras de matéria prima e de produto.

As análises microbiológicas foram realizadas para caracterização da matéria prima e do produto após o processamento. Os resultados das análises, tanto na matéria prima como no produto, apresentaram ausência de *Salmonella* sp. em 25g de amostras, e as contagens de *Staphylococcus aureus* e de clostrídios sulfito redutores foram <100UFC/g (est) e <10UFC/g (est), respectivamente. Esses resultados se enquadram dentro dos limites preconizados pela Resolução nº12/01 (Secretaria de Vigilância Sanitária, 2001).

Na **Figura 11** são apresentadas as contagens médias de bolores e leveduras, enterobactérias, bactérias lácticas e bactérias psicrotróficas na matéria prima e no produto acondicionado na embalagem A (alta barreira) ou na embalagem B (baixa barreira).

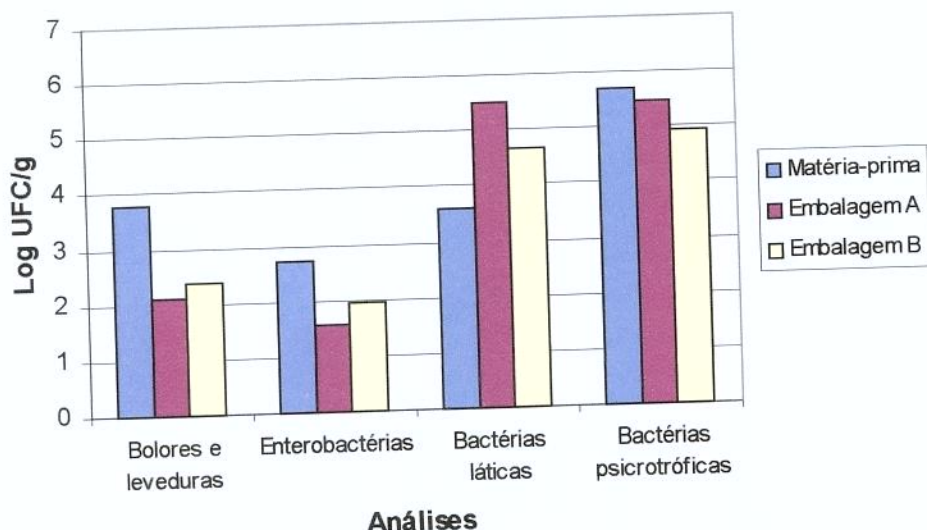


Figura 11 – Análises microbiológicas da matéria prima e do produto embalado a vácuo, após 96 horas de estocagem a 0°C. Médias de duplicatas de oito amostras de matéria-prima e de produto.

A contagem de bolores e leveduras na matéria prima foi próxima de 4 log UFC/g, e, no produto, acima de 2 log UFC/g (**Figura 11**). Essa contagem no produto foi menor que a relatada por COSTA (1999), em amostras de carne-de-sol de estabelecimentos não inspecionados (4,44 log UFC/g) e com inspeção (3,82 log UFC/g). Contagens ainda maiores de bolores e leveduras foram relatadas por NÓBREGA (1982), em amostras de carne-de-sol não embaladas e mantidas à temperatura ambiente por 96 horas após a salga. Embora não haja um limite na legislação para o crescimento de bolores e leveduras, PESTKA (1986), afirma que as contagens na carne fresca normalmente encontram-se entre 2 e 5 log UFC/g.

A matéria prima utilizada apresentou contagem de enterobactérias acima de 2 log UFC/g, enquanto que o produto acondicionado na embalagem A e B apresentou uma contagem acima de 1 log UFC/g e próximo de 2 log UFC/g, respectivamente.

A contagem de bactérias lácticas na matéria prima foi um pouco superior a 3 log UFC/g, enquanto que no produto acondicionado na embalagem A, superior a 5 log UFC/g, e no produto acondicionado na embalagem B, um pouco abaixo desse valor (**Figura 11**). Esse crescimento de bactérias lácticas no produto em relação à matéria prima se explica pela atmosfera anaeróbia criada pela embalagem, e pela baixa temperatura de armazenamento (LEU et al., 1987), sendo provável que a embalagem A, por ser de maior barreira, tenha favorecido o crescimento.

As contagens de bactérias psicrótróficas na matéria prima revelaram um número superior a 5 log UFC/g, com uma diminuição no produto, sendo que o da embalagem B ficou abaixo de 5 log UFC/g, e o da embalagem A acima desse valor (**Figura 11**). Também nesse caso, a maior barreira da embalagem A parece ter favorecido o crescimento dessas bactérias, pois segundo STILES & HASTING (1991), em condições anaeróbias, a microbiota psicrótrófica é compreendida principalmente por bactérias lácticas, que são capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores, aumentando a sanidade e a vida-de-prateleira do produto, mas que acabam por causar a sua deterioração. De acordo com UPMANN et al., (2000), o tipo de deterioração causada por bactérias lácticas é o azedamento, que normalmente não é detectado até que o número de bactérias atinja 10^8 UFC/cm².

Com relação ao estudo de toxigênese, não foram detectadas toxinas em nenhuma das amostras inoculadas e estocadas a 22, 10 e 4°C; no entanto, a 30°C, foram detectadas toxinas tanto de *S. aureus* como de *C. botulinum*.

Nas amostras controle (não inoculadas) não foram detectadas toxinas em nenhuma das temperaturas estudadas.

Na **Tabela 4** é apresentada uma síntese dos resultados da ocorrência de toxigênese em amostras embaladas a vácuo, inoculadas com *S. aureus* ou com esporos de *C. botulinum* e estocadas a 30°C.

O produto apresentou pH entre 5,3 e 5,8 e atividade de água (Aa) média de 0,96.

Na **Tabela 4**, verifica-se que a detecção de enterotoxinas de *S. aureus* a 30°C se deu a partir do segundo dia de estocagem em ambas as embalagens estudadas, mostrando que a produção de toxina de *S. aureus* é dependente do tempo e temperatura de estocagem e do tamanho do inóculo. A temperatura de 30°C parece ser altamente favorável à produção de enterotoxinas em carnes cruas e processadas. CASMAN et al., (1963), detectaram enterotoxina A em carnes suína e bovina, cozidas e cruas, bem como em presuntos inoculados com 250 UFC de *S. aureus*/cm² e mantidos a 30°C. De acordo com EVANS (1986), para a produção de enterotoxinas de *S. aureus* em níveis detectáveis, o microrganismo deve multiplicar-se no alimento, até uma população superior a 10⁶ UFC/g.

Tabela 4 - Toxigênese em amostras embaladas a vácuo, inoculadas experimentalmente e estocadas a 30°C.

Tempo (dias)	<i>S. aureus</i>		<i>C. botulinum</i>	
	Embalagem A**	Embalagem B***	Embalagem A**	Embalagem B***
1	0 / 3	0 / 3	-	-
2	1 / 3*	1 / 3*	0 / 3*	0 / 3*
3	1 / 3*	2 / 3*	-	-
5	-	-	0 / 3*	1 / 3*
6	-	-	0 / 3*	0 / 3*
7	-	-	0 / 3*	0 / 3*
8	-	-	0 / 3*	1 / 3*
10	-	-	0 / 3*	1 / 3*

___ / ___ = nº amostras tóxicas/nº de amostras inoculadas

* = amostras apresentavam amaciamento excessivo, cor e odor alterados

** permeabilidade de 9,6ccO₂/m²/dia

***permeabilidade de 40,0ccO₂/m²/dia

As amostras estocadas a 30°C apresentaram sinais de deterioração a partir do segundo dia, tendo-se observado a aparência úmida da superfície e o aroma de produto “cozido”, quando da abertura da embalagem das amostras controle, características estas que desapareciam após quinze minutos de exposição ao ambiente. Esse produto, após o cozimento, apresentava aparência e aroma característicos de carne-de-sol.

Na **Tabela 5** são apresentados os resultados de pH, atividade de água (Aa) e potencial de óxido-redução (Eh) nas amostras controle e inoculadas com *S. aureus* S6, embaladas a vácuo e estocadas a 30°C. Observa-se que os valores médios de pH e Aa estão dentro da faixa para o crescimento do microrganismo e para a produção de enterotoxinas. Com relação aos valores de Eh, eles variaram de -72 a -195mV, e, nas amostras positivas, a variação foi de -106 a -137mV. A determinação do valor de Eh de um alimento é bastante difícil porque ocorre a interação da tensão do oxigênio que envolve o alimento com a presença de compostos químicos que agem sobre o valor de Eh (FRANCO & LANDGRAF, 1996). De acordo com SMITH et al. (1983), a composição atmosférica tem efeito no crescimento e produção de enterotoxinas. Nos alimentos, elas têm sido observadas sob condições anaeróbias; entretanto, sua produção é maior sob condições aeróbias.

Os resultados das análises de toxigenese das amostras inoculadas com esporos de *C. botulinum*, acondicionadas nas embalagens A e B, e estocadas a 30°C são apresentados nas **Tabelas 6 e 7**, respectivamente.

Nas amostras acondicionadas na embalagem A (**Tabela 6**) não foram detectadas toxinas botulínicas, enquanto que nas acondicionadas na embalagem B (**Tabela 7**) foram detectadas toxinas dos tipos A e B.

Tabela 5 - Toxigenese em amostras controle e inoculadas com *Staphylococcus aureus*, embaladas a vácuo e estocadas a 30 °C.

Dias	Embalagem*	Toxigenese	Amostra	pH superfície	pH interno	Eh	Aa superfície	Aa interna
1	A	Negativo	4-3D	5,45	5,47	-72	0,95	0,96
1	A	Negativo	4-3C	5,47	5,45	-89	0,96	0,96
1	A	Negativo	14-3A	5,80	5,81	-84	0,96	0,96
1	B	Negativo	3-2D	5,58	5,54	-94	0,96	0,96
1	B	Negativo	9-2A	5,47	5,44	-108	0,96	0,96
1	B	Negativo	14-1A	5,66	5,63	-104	0,96	0,96
1	B	Negativo	18-1C	5,57	5,67	-170	0,96	0,96
2	A	Negativo	10-1A	5,61	5,62	-195	0,96	0,96
2	A	Negativo	18-3A	5,54	5,66	-132	0,96	0,96
2	A	Positivo	17-3D	5,60	5,72	-111	0,96	0,97
2	B	Positivo	2-3C	5,56	5,67	-145	0,96	0,96
2	B	Negativo	1-2C	5,42	5,59	-112	0,96	0,96
2	B	Negativo	8-2D	5,45	5,53	-120	0,97	0,97
3	A	Negativo	4-1A	5,36	5,49	-106	0,96	0,96
3	A	Positivo	14-1C	5,67	5,73	-161	0,96	0,97
3	A	Negativo	6-2D	5,45	5,65	-137	0,96	0,96
3	B	Positivo	11-2C	5,50	5,54	-109	0,96	0,97
3	B	Negativo	14-4Y	5,83	5,79	-130	0,95	0,95
3	B	Positivo	1-1D	5,35	5,51	-106	0,96	0,96
3 (controle)	A	Negativo	2-1D	5,49	5,48	-108	0,95	0,95
3 (controle)	A	Negativo	7-2B	5,11	5,52	-119	0,96	0,96
3 (controle)	A	Negativo	1-2D	5,36	5,51	-109	0,96	0,96
3 (controle)	B	Negativo	2-1B	5,24	5,52	-105	0,95	0,95
3 (controle)	B	Negativo	3-2B	5,30	5,52	-99	0,96	0,96

*Embalagem: A = 9,6ccO₂/m²/dia

B = 40,0ccO₂/m²/dia

Os resultados apresentados na **Tabela 7** demonstram a importância da interação pH, tempo e temperatura. A produção de toxinas de *C. botulinum* se deu numa só amostra (14-3B) das três analisadas no quinto dia de estocagem, e esta era a única amostra com pH >5,8. O mesmo se deu nas amostras analisadas no oitavo dia, com resultado positivo na amostra 19-4C. A única amostra positiva com pH abaixo de 5,8 foi a de número 7-4X, com pH 5,67, que apresentou toxina no décimo dia de estocagem, ocasionando a morte de um dos dois camundongos inoculados em duas repetições (dois camundongos mortos em quatro inoculados), ou seja, tratava-se de uma baixa quantidade de toxina produzida. A importância do tempo de estocagem fica evidente no fato de que outras amostras (20-1D e 20-3D) com pH >5,6, deram resultados negativos no quinto e no sétimo dia.

Nenhuma amostra acondicionada na embalagem A e inoculada com esporos de *C. botulinum* apresentou produção de toxina, no entanto, não se pode afirmar que seja uma embalagem segura, pois não foram analisadas amostras com pH >5,8 (**Tabela 6**).

Embora uma amostragem relativamente reduzida não permita conclusões definitivas, há a constatação de que a utilização de matéria-prima com pH acima de 5,8 representa um perigo quanto a produção de toxinas por *C. botulinum*.

O valor médio de Aa das amostras acondicionadas nas embalagens A e B foi de 0,96, valor ainda adequado para o desenvolvimento deste microrganismo. Com relação aos valores de Eh a variação foi de -76 a -208mV nas amostras acondicionadas na embalagem A, e de -84 a -132mV nas amostras acondicionadas na embalagem B (**Tabelas 6 e 7**). Segundo FRANCO & LANDGRAF (1996), os microrganismos anaeróbios requerem valores baixos de Eh, normalmente inferiores a -150mV. As amostras com toxigênese positiva apresentaram valores de Eh de -84, -197 e -99mV.

O número inicial de células viáveis é fator determinante na detecção de toxinas de *S. aureus* e de *C. botulinum*, pois as amostras controle (não inoculadas), estocadas a 30°C, apresentaram resultados negativos em todas as análises.

Tabela 6 – Toxigênese em amostras controle e inoculadas com *Clostridium botulinum*, acondicionadas na embalagem A (9,6ccO₂/m²/dia) e estocadas a 30°C.

Dias	Toxigênese	Amostra	pH Matéria Prima	pH superfície Produto *	pH interno Produto*	Eh*	Aa Superfície*	Aa Interna*
2	Negativo	12-2A	5,61	5,56	5,51	-110	0,96	0,96
2	Negativo	20-2D	5,69	5,54	5,51	-101	0,96	0,96
2	Negativo	16-3C	5,43	5,43	5,45	-100	0,96	0,96
5	Negativo	20-1A	5,69	5,54	5,51	-101	0,96	0,96
5	Negativo	02-4X	5,47	5,48	5,47	-108	0,95	0,95
5	Negativo	12-2C	5,61	5,56	5,55	-110	0,96	0,96
6	Negativo	07-1Y	5,67	5,42	5,41	-80	0,95	0,96
6	Negativo	05-3B	5,52	5,21	5,51	-108	0,96	0,96
6	Negativo	16-2C	5,43	5,43	5,45	-100	0,96	0,96
7	Negativo	06-2C	5,39	5,37	5,44	-99	0,95	0,96
7	Negativo	06-3A	5,39	5,37	5,44	-99	0,95	0,96
7	Negativo	11-1A	5,46	5,51	5,55	-109	0,96	0,97
8	Negativo	13-2A	5,46	5,33	5,49	-76	0,96	0,96
8	Negativo	15-4X	5,52	5,24	5,58	-98	0,96	0,96
8	Negativo	13-3D	5,46	5,33	5,49	-76	0,96	0,96
10	Negativo	04-2B	5,49	5,36	5,48	-106	0,96	0,96
10	Negativo	04-1D	5,49	5,38	5,48	-106	0,96	0,96
10	Negativo	08-1Y	5,45	5,14	5,40	-118	0,96	0,96
10 (controle)	Negativo	10-4B	5,40	5,18	5,26	-208	0,96	0,96
10 (controle)	Negativo	02-3B	5,47	5,45	5,45	-98	0,96	0,96
10 (controle)	Negativo	06-2A	5,39	5,37	5,44	-99	0,95	0,96

*médias dos pHs das fatias, estocadas por diferentes tempos e temperaturas, em amostras inoculadas com *S. aureus* S6.

Tabela 7 – Toxigênese em amostras controle e inoculadas com *Clostridium botulinum*, acondicionadas na embalagem B (40,0ccO₂/m²/dia) e estocadas a 30°C.

Dias	Toxigênese	Amostra	pH Matéria Prima	pH superfície Produto *	pH interno Produto*	Eh*	Aa Superfície*	Aa Interna*
2	Negativo	11-4A	5,46	5,58	5,55	-109	0,96	0,96
2	Negativo	10-4C	5,40	5,41	5,45	-124	0,96	0,96
2	Negativo	4-1B	5,49	5,44	5,48	-106	0,96	0,96
5	Positivo	14-3B	5,82	5,80	5,81	-84	0,96	0,96
5	Negativo	20-1D	5,69	5,54	5,51	-101	0,96	0,96
5	Negativo	11-4C	5,46	5,24	5,52	-119	0,96	0,96
6	Negativo	2-2D	5,47	5,12	5,42	-96	0,96	0,96
6	Negativo	2-2A	5,47	5,12	5,42	-96	0,96	0,96
6	Negativo	3-4D	5,51	5,20	5,54	-99	0,96	0,96
7	Negativo	20-3D	5,69	5,55	5,55	-132	0,95	0,96
7	Negativo	1-1B	5,42	5,42	5,59	-112	0,96	0,96
7	Negativo	6-3B	5,39	5,01	5,30	-118	0,95	0,95
8	Negativo	11-2D	5,46	5,50	5,54	-109	0,96	0,97
8	Positivo	19-4C	5,86	5,85	5,86	-197	0,96	0,96
8	Negativo	3-1D	5,51	5,37	5,46	-91	0,95	0,96
10	Negativo	7-3X	5,67	-	5,42	-65	0,97	0,97
10	Positivo	7-4X	5,67	5,47	5,56	-99	0,96	0,96
10	Negativo	16-4Y	5,43	5,43	5,45	-100	0,96	0,96
10 (controle)	Negativo	13-1A	5,46	5,38	5,45	-89	0,96	0,96
10 (controle)	Negativo	13-4X	5,46	5,46	5,47	-91	0,95	0,95
10 (controle)	Negativo	18-3B	5,49	5,54	5,66	-132	0,95	0,96

*médias dos pHs das fatias, estocadas por diferentes tempos e temperaturas, em amostras inoculadas com *S. aureus* S6.

Os resultados evidenciam que a estocagem de produtos cárneos à temperatura de 30°C pode representar um sério risco à saúde dos consumidores. Entretanto, pelo menos no caso da toxina botulínica, observou-se que a sua presença estava associada à deterioração, que, hipoteticamente deveria descartar a possibilidade de consumo. A este respeito, JUNQUEIRA (1994), somente detectou toxina botulínica em amostras de presunto cozido inoculados com esporos de *C. botulinum* tipos A e B, após 12 dias de estocagem a 30°C, sendo que nesta condição o produto já estava deteriorado e portanto, inaceitável para o consumo.

5 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem as seguintes conclusões:

1. O produto processado de acordo com as boas práticas de fabricação e embalado a vácuo, mesmo quando submetido a condições de extremo abuso de tempo e temperatura, resultando na sua deterioração, não apresentou desenvolvimento de toxinas de *Staphylococcus aureus* e de *Clostridium botulinum*.
2. Nas amostras inoculadas, os principais fatores que influenciaram a produção de toxinas, tanto de *S. aureus* como de *C. botulinum*, foram o número inicial de células ou esporos viáveis, o tempo e a temperatura de estocagem do produto.
3. No produto inoculado com esporos de *C. botulinum*, foi evidenciado que a produção de toxinas foi influenciada pelo pH, com a constatação da mesma principalmente em valores de pH maior que 5,8.
4. As toxinas de *S. aureus* e de *C. botulinum* somente foram detectadas quando o produto inoculado já apresentava sinais evidentes de deterioração, inibindo a possibilidade de consumo. Entretanto, essas alterações desapareciam após a abertura da embalagem e exposição ao ambiente por 15 minutos.
5. A permeabilidade das embalagens aparentemente não influenciou a produção de toxinas por *S. aureus*; já a produção de toxinas de *C. botulinum* ocorreu apenas em amostras acondicionadas em embalagem de baixa barreira ao oxigênio.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, n.19, p.15-85, 1990. Supplement.
2. BERGDOLL, M.S. Staphylococcal intoxications. In: RIERMANN H. & BRUAN, F.L. **Food-Borne Infections and Intoxications**. 2ed. New York: Academic Press, 1979. p. 443-494.
3. _____. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989, cap.11, p. 463-523.
4. _____. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, n.2, p.91-100, 1990.
5. _____. Staphylococcal intoxication in Mass Feeding. In: Tu, A.T. **Food Poisoning: Handbook of natural toxins**. New York: Marcel Dekker, 1992, v.7, cap.2, p. 25-47.
6. BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
7. BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J. F., ZUCCA, J. **Microbiologia Alimentaria**. Zaragoza, Acribia, 1994, 437p.
8. BRYAN, F.L. Staphylococci. In: DEFIGUEIREDO, M.P.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects**. Westport: The Avi Publishing Company, 1976. p. 12-128.
9. CALDAS, R.B. **Relatório de Viagem**. In: BRASIL. Ministério da Agricultura (Processo M.A. – 030/00859/66). Rio de Janeiro, 1966.

10. CASMAN, E.P.; MCCOY, D.W.; BRANDLY, P.J. Staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. **Applied Microbiology**, Washington, v.11, p. 498-500, 1963.
11. CATO, E.P.; GEORGE, W.L.; FINEGOLD, S.M. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23^{AL}. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, v.2. p. 1041-1200.
12. CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Botulism in the United States, 1899-1977: Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers**, Washington, DC., U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1979. 41p (Public Health Service Publication n. 74-8279).
13. _____ **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 1993-1997**. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm> >. Acesso 14 nov. 2001.
14. COSTA, E.L. **Avaliação microbiológica da carne de sol comercializada em João Pessoa – PB**. João Pessoa, 1999. 77p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba.
15. DOLMAN, C.E. Botulism as a world health problem. In: LEWIS, R.H., CASSEL, K. **Botulism**. Washington, DC. U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1964, p. 3-32.
16. EKLUND, M.W. Significance of *Clostridium botulinum* in fishery products preserved short of sterilization. **Food Technology**, Chicago, v.36, n.12, p. 107-112, 115, 1982.
17. ELLIOTT, H.P. Predictive microbiology and HACCP. **Journal of Food Protection**, Ames. p. 48-53, 1996. Supplement.

18. EVANS, J.B. Staphylococci. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Meat and Poultry Microbiology**. Advances in meat research – v.2, Avi Publishing Company, Connecticut, 1986. 436p.
19. EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.7, n.4, p.311-316, 1988.
20. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**, 6ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, 1984.
21. FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap: 4, p. 33-81.
22. FRAZIER, W. C. & WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza, Acribia, 1993, 681p.
23. GÁRCIA de FERNANDO, G. D., NYCHAS, G. J. E. & PECK, M. W. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.2, p.221-231, 1995.
24. GARCIA, T.; MARTÍ, R.; SANZ, B.; HERNÁNDEZ, P.E. Revisión: Extensión de la vida útil de la carne fresca I: envasado en atmosferas modificada y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.35, n.1, p.1-18, 1995.
25. GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.9, n.4, p. 327-360, 1989.

26. _____; RIEMANN, H.; SADLER, W.W. Production of enterotoxin B in cured Meats. **Journal of Food Science**, Chicago, v.34, n.1, p.62-68, 1969.
27. GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. Prevenção do controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p. 6-11, 1993.
28. GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**, v.43 (s): p.99-109, 1996.
29. GOMEZ-LUCÍA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A. Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.6, p.1447-1451, 1989.
30. GRIFFIN, D. B., SAVELL, J. W., SMITH, G. C., VANDERZANT, C., TERRELL, R. N., LIND, K. D. & GALOWAY, D. E. Centralised packaging of beef loin steaks with different oxygen-barrier films: Physical and sensory characteristics. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.4, p.1059-1069, 1982.
31. HAUSCHILD, A.H.W. *Clostridium botulinum* In: DOYLE, M.P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 111-191.
32. _____; ARIS, B.J.; HILSHEIMER, R. *Clostridium botulinum* in marinated products. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. Canada, v.8, n.2, p.84-88, 1975.
33. _____. *Clostridium botulinum* toxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam. v.10, n.2, p.113-124, 1990.
34. HOLT, J.L.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
35. HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**, 13ed., Washington D.C., A.O.A.C., 1980.

36. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration**. Toronto: University of Toronto Press, 1978. p.140-143.
37. _____. **Microorganisms in Foods 3. Microbial ecology of foods**. San Diego: Academic Press, 1980. 332p.
38. _____. **Microorganisms in Foods 5. Characteristics of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 513p.
39. INSALATA, N.F.; WITZEMAN, S.I.; FREDERICKS, G.J. et al. Incidence study of spores of *Clostridium botulinum* in convenience foods. **Applied Microbiology**, Washington, v.17, n.4, p. 542-544, 1969.
40. JUNQUEIRA, V.C.A. **Avaliação da incidência de *Clostridium botulinum* e da produção de toxina em mortadela e presunto**. Campinas, 1994. 57p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
41. _____. & LEITÃO, M.F.F. Otimização de meio de cultura para contagem de *Clostridium botulinum* em alimentos. **Anais do II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas, n.463, p.153-154, 1997.
42. KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18^{AL}, (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958, 153). In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, v.2. p. 1013-1035.
43. KOKAN, N.; BERGDOLL, M.S. Detection of low enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.11, p.2675-2676, 1987.

44. LARA, J.A.F.; SHIMOKOMAKI, M.; PINTO, M.F.; DUTRA, I.S. Botulismo: Risco decorrente do processamento inadequado dos alimentos. O charque como enfoque. **Higiene Alimentar**, São Paulo. v.13, n.66/67, 1999.
45. LEISNER, J. J., GREER, G. G., DILTS, B. D. & STILES, M. E. Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage life of beef stored under vacuum and in air. **International Journal of Food microbiology**, Amsterdam, v.26, n.2, p.231-243, 1995.
46. LEITÃO, M.F.F. Microrganismos patogênicos na carne e derivados. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.59, p.15-48, 1978.
47. _____. Controle do desenvolvimento microbiano no processamento industrial da carne e produtos cárneos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.21-39, 1984.
48. _____. DELAZARI, I. *Clostridium botulinum* em solos no Estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v.13, p.75-82, 1983.
49. LEU, R., KEETON, J.T., GRIFFIN, D.B., SAVELL, J.W., VANDERZANT, C. Microflora of vacuum packaged beef steaks and roasts treated with an edible acetylated monoglyceride. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.7, p.554-556, 1987.
50. McCARTY, M. Staphylococci. In: DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.B. **Microbiology**. 2ed. Hagerstown: Harper & Row, 1973, cap.IV, p. 727-739.
51. McDONALD, K. & SUN, D. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 52, n.1-2, p.1-27, 1999.

52. NÓBREGA, D. M. **Contribuição ao estudo da carne de sol visando melhorar sua conservação.** Campinas, 1982. 81p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
53. NORMAN, G.A.; CORTE, O.O. Dried salted meats: charque and carne de sol. **FAO Animal Production and Health Paper 51.** FAO – UN, Rome, 1985. 32p.
54. NYCHAS, G.J.E.; ARKOUELOS, J.S. Staphylococci: their role in fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 176S-188S, 1990. Supplement.
55. OLIVEIRA, T.C.R.M.; HIROOKA, E.Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.2, p.121-131, 1996.
56. OLIVEIRA A.M. **Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos, em alimentos.** Campinas, 1999. 101p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
57. ORDEN, J.A.; GOYACHE, J. HERNÁNDEZ, J.; DOMÉNECH, A.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCIA, E. Applicability of an immunoblot technique combined with a semiautomated electrophoresis system for detection of staphylococcal enterotoxins in food extracts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.12, p.4083-4085, 1992.
58. PEREIRA, M.L.; PEREIRA, J.L.; SERRANO, A.M.; BERGDOLL, M.S. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.66/67, p.48-55, 1999.
59. PESTKA, J.J. Fungi and mycotoxins in meats. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Meat and Poultry Microbiology.** Advances in meat research – v.2, Avi Publishing Company, Connecticut, 1986. 436p.

60. ROBBINS, R.N.; BERGODLL, M.S. Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.47, n.3, p.172-176, 1984.
61. SAKAGUCHI, G. Botulism. In: RIEMANN, H.; BRYAN, F.L. **Food-Borne Infections and Intoxications**. 2ed. New York: Academic Press, 1979, p.389-442.
62. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 12/01**, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 07 jul. 2001.
63. SHIMOKOMAKI, M.; FRANCO, B.D.G.M.; CARVALHO JR, B.C. Charque e produtos cárneos, tecnologia e conservação – uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p. 25-35, 1987.
64. SILLIKER, J.H.; WOLFE, S.K. Microbiological safety considerations in controlled-atmosphere storage of meats. **Food Technology**, Chicago, v.34, n.3, p.59-63, 1980.
65. SILVA, M.D.C. **Incidência de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico e coliformes fecais em carne de sol comercializada na cidade do Recife-PE**. Recife, 1991, 77p. Tese (Mestre em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.
66. SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of food environment on Staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.6, p.545-555, 1983.
67. SMITH, L.D.S. **Botulism: The organism, its toxins, the disease**. Springfield, II, USA Charles C. Thomas, 1977, 236p.

68. SOFOS, J.M.; BUSTA, F.F.; ALLEN, C.F. Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats. A review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.42, n.9, p. 739-770, 1979.
69. _____. Botulism in home-processed foods. In: TU, A.T. **Food Poisoning: Handbook of natural toxins**. New York: Marcel Dekker, 1992, v.7, cap.8, p. 171-203.
70. SOLOMON, H.M.; KAUTTER, D.A.; LYNT, R.K. Common characteristics of the Swiss and Argentine strains of *Clostridium botulinum* type G. **Journal of Food Protection**, Ames, v.48, n.1, p.7-10, 1985.
71. SPERBER, W.H. Requirements of *Clostridium botulinum* for growth and toxin production. **Food Technology**, Chicago, v.36, n.2, p.90-94, 1982.
72. STILES, M. E. & HASTING, J. W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. **Trends in Food Science & Technology**, v.2, n.10, p.247-251, 1991.
73. SUGIYAMA, H. *Clostridium botulinum* neurotoxin. **Microbiological reviews**, Washington, v.44, n.3, p.419-448, 1980.
74. TATINI, S.R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.36, n.11, p. 559-563, 1973.
75. UPMANN, M.; PAULSEN, P.; JAMES, S.; SMULDERS, F.J.M. The microbiology of refrigerated meat. **Fleischwirtschaft International**. n.3, p. 38-45, 2000.
76. VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, R.D.F. **Compendium of methods for the microbiological examinations of foods**. 15 ed., Washington, D.C., APHA 1992, 1219p.

77. VARADARAJ, M.C.; RANGANATHAN, B. Staphylococcal enterotoxins – methods of production and detection – a review. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v.42, n.2, p. 267-276, 1989.
78. VASCONCELOS, O. Por cima da carne-seca. **Revista Globo Rural**, v.1, n.5, p. 15-20, 1986.
79. VERNOZY-ROZAND, C.; MEYRAND, C.M.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; JAUBERT, G.; PERRINS, G.; LAPEYRE, C.; RICHARD, Y. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses. **Journal of Dairy Research**, Denver, v.65, n.2, p.273-281, 1998.
80. VIEIRA NETO, J. **Aspectos tecnológicos da fabricação da “carne de sol”**. Niterói, 1982. 46p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense.