



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



***Clostridium estertheticum* E *Clostridium gasigenes*: DETECÇÃO,
ISOLAMENTO, RASTREAMENTO E CONTROLE NO
PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA RESFRIADA EMBALADA
A VÁCUO**

Vanessa Pires da Rosa
Química de Alimentos
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em
Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS – SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R71c Rosa, Vanessa Pires da
Clostridium estertheticum E *Clostridium gasigenes*: detecção,
isolamento, rastreamento e controle no processamento de carne
bovina resfriada embalada a vácuo / Vanessa Pires da Rosa. --
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. *Clostridium estertheticum*. 2. *Clostridium gasigenes*.
3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Alimentos -
Microbiologia. 5. Tecnologia - Carne. I. Kuaye, Arnaldo
Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes*: detection,
isolation, tracking and control in processing of vacuum-packed chilled bovine
meat

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Clostridium estertheticum*,
Clostridium gasigenes, Polimerase chain
reaction, Food - Microbiology, Technology -
Meat

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Marise Aparecida Rodrigues Polloni

Carmen Josefina Contreras Castillo

Valéria Christina Amstalden Junqueira

Ernani Porto

Pedro Eduardo de Felício

Celina Mara Soares

José Luiz Pereira

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente (Orientador)

Profa. Dra. Marise Aparecida Rodrigues Polloni
Membro

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
Membro

Profa. Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo
Membro

Prof. Dr. Ernani Porto
Membro

Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício
Membro

Dra. Celina Mara Soares
Membro

Prof. Dr. José Luiz Pereira
Membro

***A DEUS por estar aqui!
Aos meus pais, Paulo e Valda,
por todo amor que demonstraram!!!
Obrigada por serem meu exemplo de vida,
por me amarem e por acreditarem em mim!!!***

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo;

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação, oportunidade, respeito e incentivo;

À UNICAMP, em especial à Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela acolhida e pela estrutura oferecida para o desenvolvimento dos trabalhos;

Ao CNPq pela concessão bolsa de estudos e auxílio pesquisa durante a execução do curso;

À FAPESP pelo auxílio financeiro à pesquisa;

À Profa. Dra Marise Aparecida Rodrigues Pollonio, à Profa. Dra Carmen Josefina Contreras Castillo, à Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira, ao Dr. Ernani Porto, ao Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício, à Dra. Celina Mara Soares e ao Prof. Dr. José Luiz Pereira pelas sugestões e correções da tese;

Aos meus familiares, especialmente meus pais Paulo e Valda, pelo apoio e compreensão;

À Dirce Yorika Kabuki pela amizade, pelo convívio e ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho;

À Raquel Souza Massulo pelo companheirismo, amizade e parceria na execução do experimento;

Às minhas grandes e maravilhosas amigas Luciana Fontes, Cláudia Fideles Marinho, Carolina de Sousa, Luciana Esper, Daniela Veira Amaral pela amizade, apoio e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Luciana, Dirce, Isabela, Vanessa, Pamela, André, Maristela, Raquel, Marisa, Beatriz, Meg, Marcília, Juliane, Fátima, Juliana Perri e D. Denir pela amizade e incentivo;

À todos os meus colegas, amigos e companheiros Paula, Leomar, Luciene, Guilherme (Pira), Márcia D'ávila, Adriano, Márcio, Eduardo, Michele, Claudio, Milena, Daniela, Nelisa, Pri Mamede, Emanuelle, Sérgio, Carol, Lílian, Ricardo, Eveline, Ângela, Anderson.

À Paula Adriana Bizarri e a todos os funcionários das empresas A e B pela acolhida, amizade e apoio na execução deste trabalho.

Às empresas A e B pelo apoio e grande colaboração fundamental para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Ademir Cabral da JohnsonDiversey pelo apoio e colaboração nos testes esporicidas;

Aos funcionários do DTA/FEA/UNICAMP pelo apoio e colaboração;

Aos colegas de pós-graduação da FEA/UNICAMP pelo companheirismo;

À todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, da realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

| | |
|--|-------|
| LISTA DE FIGURAS..... | xvii |
| LISTA DE TABELAS..... | xviii |
| RESUMO..... | xxvii |
| SUMMARY | xxxii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Ojetivo geral | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 3 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1 Principais microrganismos na produção de carne bovina embalada a vácuo | 5 |
| 3.1.1 Criação | 5 |
| 3.1.2 Transporte do animal | 7 |
| 3.1.3 Abate | 8 |
| 3.1.4 Esfolação..... | 9 |
| 3.1.5 Evisceração | 11 |
| 3.1.6 Lavagem | 11 |
| 3.1.7 Resfriamento..... | 12 |
| 3.1.8 Corte e desossa..... | 14 |
| 3.2 Microbiota da carne bovina embalada a vácuo | 14 |
| 3.3 <i>Clostridium estertheticum</i> e <i>Clostridium gasigenes</i> | 18 |
| 3.3.1 Caracterização de <i>C. estertheticum</i> e <i>C.gasigenes</i> | 18 |
| 3.3.2 Deterioração “blown- pack” | 24 |
| 3.3.3 Isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 27 |
| 3.3.4 Métodos moleculares para identificação e caracterização de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 28 |
| 3.3.5 Ocorrência de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 30 |
| 3.3.6 Controle de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 32 |
| 3.4 Principais sanitizantes utilizados em matadouros-frigoríficos..... | 33 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 Avaliação de diferentes métodos de extração de DNA para detecção de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de carne | 41 |
| 4.1.1 Microrganismos..... | 42 |
| 4.1.2 Preparo da suspensão de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 42 |
| 4.1.3 Obtenção e preparo das amostras de carne | 43 |
| 4.1. 4 Inoculação..... | 43 |

| | |
|--|----|
| 4.1.5 Contagem de <i>Clostridium gasigenes</i> e <i>Clostridium estertheticum</i> | 43 |
| 4.1.6 Extração de DNA | 44 |
| 4.1.7 Técnica de PCR..... | 45 |
| 4.2 Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> no ambiente de empresa de abate bovino e de processamento de carne resfriada embalada a vácuo | 47 |
| 4.2.1 Empresas..... | 48 |
| 4.2.2 Coleta das amostras | 48 |
| 4.2.2.1 Piso e paredes..... | 49 |
| 4.2.2.2 Fezes e intestino | 49 |
| 4.2.2.3 Ralo | 49 |
| 4.2.2.4 Canaleta de sangria | 49 |
| 4.2.2.5 Pele e pata do animal | 49 |
| 4.2.2.6 Equipamentos | 50 |
| 4.2.2.7 Superfície de carcaças..... | 50 |
| 4.2.2.9 Evaporadores..... | 51 |
| 4.2.2.10 Carnes embaladas a vácuo..... | 51 |
| 4.2.3 Transporte e armazenamento das amostras..... | 51 |
| 4.2.4 Detecção de <i>C. gasigenes</i> e <i>C. estertheticum</i> pela técnica da PCR direto das amostras ambientais e de carne embalada a vácuo | 52 |
| 4.2.4.1 Extração do DNA | 52 |
| 4.2.4.2 Técnica da PCR..... | 52 |
| 4.2.5 Isolamento do <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 52 |
| 4.2.5.1 Técnica de isolamento A (isolamento A) | 52 |
| 4.2.5.2 Técnica de isolamento B (isolamento B) | 53 |
| 4.2.5.3 Técnica de isolamento C (isolamento C)..... | 54 |
| 4.3 Rastreamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em cepas isoladas da planta de abate de bovinos, utilizando-se a técnica PCR-RFLP | 58 |
| 4.3.1 Cepas padrão e isolados | 58 |
| 4.3.2 Extração do DNA | 58 |
| 4.3.3 Técnica da PCR- RFLP..... | 58 |
| 4.4 Ocorrência de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de carnes resfriadas embaladas a vácuo obtidas do comércio | 59 |
| 4.4.1 Amostras..... | 59 |
| 4.4.2 Amostragem..... | 60 |
| 4.4.3 Detecção de <i>C. gasigenes</i> e <i>C. estertheticum</i> pela técnica da PCR..... | 60 |
| 4.4.4 Isolamento do <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 60 |
| 4.4.5 Tipagem genética dos isolados..... | 60 |
| 4.5 Análise da composição de gases em amostras estufadas..... | 60 |
| 4.5.1 Amostras..... | 60 |
| 4.5.2 Análise quantitativa de gases por cromatografia gasosa | 61 |
| 4.5.3 Análise qualitativa por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas e headspace | 61 |
| 4.6 Atividade de diferentes sanitizantes sobre os esporos de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 62 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.6.1 | Preparo da suspensão de esporos de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 62 |
| 4.6.2 | Contagem de esporos de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 62 |
| 4.6.3 | Sanitizantes | 64 |
| 4.6.4 | Teste esporicida..... | 64 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 5.1. | Avaliação de diferentes métodos de extração de DNA para detecção de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de carne | 65 |
| 5.2 | Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> no ambiente de empresa de abate bovino e de processamento de carne resfriada embalada a vácuo | 73 |
| 5.2.1 | Empresa A | 73 |
| 5.2.1.1. | Coleta 1..... | 73 |
| 5.2.1.2. | Coleta 2..... | 78 |
| 5.2.1.3. | Coleta 3..... | 82 |
| 5.2.1.4. | Coleta 4..... | 87 |
| 5.2.1.5. | Coleta 5..... | 91 |
| 5.2.1.6 | Comparação dos resultados positivos para detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> , em função das técnicas analíticas empregadas nas amostras da empresa A | 96 |
| 5.2.2 | Empresa B | 103 |
| 5.2.2.1 | Coleta 1 | 103 |
| 5.2.2.2 | Coleta 2 | 107 |
| 5.2.2.3 | Coleta 3 | 112 |
| 5.2.2.4. | Coleta 4..... | 116 |
| 5.2.2.5 | Coleta 5 | 121 |
| 5.2.2.6 | Comparação dos resultados positivos para detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> , em função das técnicas analíticas empregadas nas amostras da empresa B..... | 125 |
| 5.2.3 | Comparação da detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> entre as empresa A e B..... | 131 |
| 5.3 | Rastreamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasignes</i> em cepas isoladas da planta de abate de bovinos e carne bovina embalada a vácuo, utilizando a técnica RFLP | 133 |
| 5.4 | Ocorrência e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em carnes resfriadas embaladas a vácuo obtidas do comércio | 148 |
| 5.5 | Análise da composição de gases em amostras estufadas | 151 |
| 5.6 | Atividade de diferentes sanitizantes sobre os esporos de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 152 |
| 5.6.1 | Produção e contagem de esporos de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 152 |
| 5.6.2 | Teste esporicida..... | 153 |
| 6. | CONCLUSÕES | 155 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 157 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fotomicrografia de contraste de fases de células vegetativas (esquerda) e esporos (direita) de <i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i> | 20 |
| Figura 2. Fotomicrografia de contraste de fases de células vegetativas (esquerda) e esporos (direita) de <i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i> | 20 |
| Figura 3. Fotomicrografia de contraste de fases de células vegetativas (a) e esporos (b) de <i>C. gasigenes</i> | 22 |
| Figura 4. Carne bovina embalada a vácuo com deterioração “Blown-pack”, ocasionada por <i>C. estertheticum</i> | 25 |
| Figura 5. Sistema de anaerobiose Glove bag™ modelo X-37-27 | 39 |
| Figura 6. Câmara de anaerobiose Shell lab™ modelo Bactron II Chamber | 39 |
| Figura 7. Fluxograma do experimento utilizado para a avaliação de diferentes métodos de extração de DNA, para detecção de <i>C. gasigenes</i> e <i>C. estertheticum</i> em carne. | 41 |
| Figura 8. Esquema para detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> na planta de abate de bovinos e em carne bovina embalada a vácuo | 47 |
| Figura 9. Pontos de coleta de amostras de superfície de meia carcaça de bovino. | 50 |
| Figura 10. Fluxograma da técnica de isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> com aplicação de choque térmico – isolamento A, amostras ambientais | 55 |
| Figura 11. Fluxograma da técnica de isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> – isolamento B, amostras ambientais | 56 |
| Figura 12. Fluxograma da técnica de isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> de carne bovina embalada a vácuo – isolamento C | 57 |
| Figura 13. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. estertheticum</i> , obtidos através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10 ⁸ ; 2: 10 ⁷ ; 3: 10 ⁶ ; 4: 10 ⁵ ; 5: 10 ⁴ ; 6: 10 ³ ; 7: 10 ² ; 8: 10 ¹ e C: controle positivo..... | 66 |
| Figura 14. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. estertheticum</i> , através do método de extração B. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso moleclar, 1: 10 ⁸ ; 2: 10 ⁷ ; 3: 10 ⁶ ; 4: 10 ⁵ ; 5: 10 ⁴ ; 6: 10 ³ ; 7: 10 ² ; 8: 10 ¹ e C: controle positivo. | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 15. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. estertheticum</i> , através do método de extração C. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador peso molecular, 1: 10^8 ; 2: 10^7 ; 3: 10^6 ; 4: 10^5 ; 5: 10^4 ; 6: 10^3 ; 7: 10^2 ; 8: 10^1 e C: controle positivo. | 67 |
| Figura 16. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. estertheticum</i> , através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^8 ; 2: 10^7 ; 3: 10^6 ; 4: 10^5 ; 5: 10^4 ; 6: 10^3 ; 7: 10^2 ; 8: 10^1 e C: controle positivo. | 67 |
| Figura 17. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. gasigenes</i> , através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo. | 70 |
| Figura 18. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. gasigenes</i> , através do método de extração B. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo. | 71 |
| Figura 19. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. gasigenes</i> , através do método de extração C. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo. | 71 |
| Figura 20. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de <i>C. gasigenes</i> , através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo. | 72 |
| Figura 21. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S de <i>C. gasigenes</i> , através do método de extração B. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo. | 72 |
| Figura 22. Distribuição de amostras positivas, pela detecção direta por PCR e isolamento A e B de <i>C. estertheticum</i> , em ambientes do abatedouro e processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo, da Empresa A, nas cinco coletas..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| Figura 23. Distribuição de amostras positivas, pela detecção direta por PCR e isolamento C de <i>C. estertheticum</i> , em carne bovina resfriada embalada a vácuo, da Empresa A, nas cinco coletas. | 99 |
| Figura 24. Distribuição da frequência <i>C. estertheticum</i> , pelas técnicas de detecção direta e isolamento A, em amostras de ambientes da Empresa A, nas cinco coletas. | 101 |
| Figura 25. Distribuição de amostras positivas, pelas técnicas de detecção por PCR direta e isolamento A e B de <i>C. estertheticum</i> , em ambientes de abatedouro de bovinos e processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo, nas cinco coletas da Empresa B. | 127 |
| Figura 26. Distribuição da presença de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> , pelas técnicas de detecção por PCR direta e de isolamento A, em amostras de cortes cárneos embalados a vácuo nas cinco coletas da Empresa B..... | 127 |
| Figura 27. Distribuição da frequência de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> , pelas técnicas de detecção por PCR direta e de isolamento A em amostras de ambientes da Empresa B, nas cinco coletas..... | 129 |
| Figura 28. Distribuição de amostras positivas, pelas técnicas de detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> nas Empresas A e B. | 132 |
| Figura 29. Quantidade de isolados de <i>C. estertheticum</i> por locais nas Empresas A e B..... | 132 |
| Figura 30. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima AluI para cepas isoladas de <i>C. estertheticum</i> | 133 |
| Figura 31. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima HaeIII para cepas isoladas de <i>C. estertheticum</i> | 135 |
| Figura 32. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima HhaI para cepas isoladas de <i>C. estertheticum</i> | 137 |
| Figura 33. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima TaqI para cepas isoladas de <i>C. estertheticum</i> | 139 |
| Figura 34. Gel de agarose dos produtos de restrição das enzimas HhaI (a), HaeIII (b), TaqI (c) e AluI (d) para cepas isoladas de <i>C. gasigenes</i> | 147 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Principais fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o desenvolvimento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> | 21 |
| Tabela 2. Algumas características bioquímicas de clostrídios psicrófilos e psicrotróficos | 23 |
| Tabela 3. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 1..... | 76 |
| Tabela 4. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 1. .. | 78 |
| Tabela 5. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 2..... | 80 |
| Tabela 6. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 2. .. | 82 |
| Tabela 7. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 3..... | 85 |
| Tabela 8. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 3. .. | 87 |
| Tabela 9. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 4..... | 89 |
| Tabela 10. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 4..... | 91 |
| Tabela 11. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 5. | 93 |
| Tabela 12. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 5..... | 95 |
| Tabela 13. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 1. | 104 |
| Tabela 14. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 1..... | 106 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 15. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 2. | 109 |
| Tabela 16. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 2. | 111 |
| Tabela 17. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 3. | 113 |
| Tabela 18. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 3. | 115 |
| Tabela 19. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 4. | 118 |
| Tabela 20. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 4. | 120 |
| Tabela 21. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 5. | 122 |
| Tabela 22. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 5. | 124 |
| Tabela 23. Grupos de <i>C. estertheticum</i> obtidos pela técnica RFLP | 141 |
| Tabela 24. Perfis da PCR-RFLP do gene 16S rDNA de <i>C. estertheticum</i> encontrados na empresa A. | 143 |
| Tabela 25. Grupos de <i>C. gasigenes</i> obtidos pela técnica RFLP | 147 |
| Tabela 26. Detecção e isolamento de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> em amostras de carne bovina resfriada embalada a vácuo adquiridas no comércio de Campinas-SP. | 148 |
| Tabela 27: Composição quantitativa de alguns componentes da composição gasosa em embalagens estufadas de carne bovina embalada a vácuo. | 151 |
| Tabela 28. Médias e desvio padrão dos resultados de contagens de esporos para <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> obtidos com diferentes metodologias. | 152 |
| Tabela 29. Médias e desvio padrão do fator de inativação (log de UFC/mL) de esporos de <i>C. estertheticum</i> em diferentes sanitizantes. | 153 |
| Tabela 30. Médias e desvio padrão do fator de inativação (log de UFC/mL) de esporos de <i>C. gasigenes</i> em diferentes sanitizantes. | 153 |

RESUMO

Os estabelecimentos de abate de bovinos no Brasil que realizam comércio internacional ainda encontram dificuldades quanto controle microbiológico da carne. Dentre elas, destaca-se o estufamento da embalagem da carne embalada a vácuo refrigerada, devido à contaminação por clostrídios psicotróficos e psicrófilos deteriorantes como o *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*. Além dos prejuízos econômicos, a contaminação causa forte impacto negativo às marcas comerciais dos produtos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras ambientais e de carnes embaladas a vácuo, resfriadas, provenientes diretamente de empresas produtoras, e em carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo comerciais, bem como avaliar o controle destes microrganismos pela utilização de agentes sanitizantes. A relevância desta pesquisa fundamenta-se na carência de trabalhos sobre o tema, associada à particularidade dos microrganismos anaeróbios estritos que exigem para a sua detecção, isolamento e caracterização metodologias de difícil execução. A análise dos resultados globais relacionados às diferentes técnicas utilizadas para detecção e isolamento dos microrganismos revelou que, embora a técnica de detecção direta por PCR apresente uma taxa bem maior de amostras positivas (20-26 amostras) em relação às técnicas de isolamento (6-11 amostras), a utilização de ambas pode representar uma importante ferramenta para o diagnóstico da contaminação microbiana ao longo do processamento destes produtos. A presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foi observada em amostras diversas como superfícies de equipamentos, carcaças e outras, além do próprio produto final, evidenciando um elevado nível de contaminação cruzada ao longo do processamento. Em particular, destaca-se a presença dos microrganismos em equipamentos que apresentam configuração física propícia ao acúmulo de sujidades e conseqüente dificuldade de higienização, como serra elétrica, rolete para retirada de couro e evaporador de câmara fria. A utilização da técnica PCR-RFLP permitiu verificar a existência de diferentes genótipos de isolados de *C. estertheticum* como também a constatação do elevado nível de

contaminação cruzada da carne exposta ao longo das etapas de processamento por fontes como equipamentos, carcaças e ambientes diversos. O efetivo controle dos esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* por agentes químicos pôde ser observado in vitro e os sanitizantes a base de ácido peracético a 500 mg/L e peróxido de hidrogênio a 200 mg/L apresentaram melhor ação esporicida para *C. estertheticum* e *C. gasigenes* quando comparado ao hipoclorito de sódio a 100 mg/L por 15 minutos. Os resultados do presente trabalho colocam em evidência a variedade de fontes de contaminação cruzada às quais a carne é submetida ao longo da cadeia produtiva, e a conseqüente necessidade de programas de higienização mais rigorosos e efetivos para o controle de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* nos matadouros-frigoríficos.

contaminação cruzada da carne exposta ao longo das etapas de processamento por fontes como equipamentos, carcaças e ambientes diversos. O efetivo controle dos esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* por agentes químicos pôde ser observado in vitro e os sanitizantes a base de ácido peracético a 500 mg/L e peróxido de hidrogênio a 200 mg/L apresentaram melhor ação esporicida para *C. estertheticum* e *C. gasigenes* quando comparado ao hipoclorito de sódio a 100 mg/L por 15 minutos. Os resultados do presente trabalho colocam em evidência a variedade de fontes de contaminação cruzada às quais a carne é submetida ao longo da cadeia produtiva, e a conseqüente necessidade de programas de higienização mais rigorosos e efetivos para o controle de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* nos matadouros-frigoríficos.

SUMMARY

The Brazilian bovine slaughterhouses involved in international commerce are still having difficulties with the microbiological control of their meat. Amongst these difficulties, the swelling of refrigerated vacuum packed beef due to contamination with deteriorative psychrotrophic and psychrophilic clostridia, such as *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes*, stands out. Apart from the economic damage, such contamination causes a strongly negative impact on the commercial brands of these products. The objectives of this study were to evaluate the presence of *C. estertheticum* and *C. gasigenes* in beef samples maintained at room temperature and in chilled vacuum packed beef coming directly from the manufacturing companies, as well as in commercially produced chilled vacuum packed beef, and also evaluate the control of these microorganisms using sanitizing agents. The relevance of this research is based on the lack of studies about this subject, associated with the particularity of strict anaerobic microorganisms that require isolation and characterization for detection, since such methodology is very difficult to carry out. An analysis of the overall results related

to the different techniques used in the detection and isolation of these microorganisms, showed that although the PCR direct detection technique presented a much higher rate of positive samples (20-26 samples) in relation to the isolation techniques (6-11 samples), the use of both techniques could represent an important tool in the diagnosis of microbial contamination throughout the processing of this product. The presence of *C. estertheticum* and *C. gasigenes* was observed in various samples, such as equipment surfaces, carcasses and others, apart from in the final products themselves, providing evidence of a high level of cross contamination throughout processing. In particular, the presence of these microorganisms on equipment with a physical configuration facilitating accumulation of dirt with a consequent difficulty for sanitation, such as electric saws, leather removal drums and the cold chamber evaporator, stood out. The use

of the PCR-RFLP technique allowed one to verify the existence of different genotypes of the *C. estertheticum* isolates, as also to show a high level of cross contamination by *C. estertheticum* and *C. gasigenes* of the beef exposed to various sources of contamination, such as equipment, carcasses and various other ambiances, during processing. The effective control of the *C. estertheticum* and *C. gasigenes* spores by chemical agents could be observed *in vitro* using 100 mg/L sodium hypochlorite for 15 minutes, and 500 mg/L peracetic acid or 200 mg/L hydrogen peroxide for 5 minutes. The results of the present work make the variety of sources of cross contamination to which the meat is submitted throughout processing, evident, and the consequent need for more rigorous and effective hygienization programs to control *C. estertheticum* and *C. gasigenes* in slaughterhouses-refrigerated packing houses.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que mais exporta carne bovina. Em dezembro de 2007, atingiu uma fatura de US\$ 3.487 bilhões, sendo 2.532 milhões de toneladas de carnes exportadas (ABIEC, 2007). Apesar dos bons resultados da exportação, os estabelecimentos de abate de bovinos no Brasil que realizam comércio internacional encontram, ainda, dificuldades de adaptação estrutural a esta grande demanda, gerando graves problemas quanto à qualidade da carne. Dentre eles, destaca-se a deterioração da carne bovina resfriada embalada a vácuo.

A carne bovina resfriada é um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, por apresentar condições como: elevada atividade de água, pH favorável ao crescimento e, ainda, elevado percentual de proteínas, minerais e vitaminas. A deterioração é fortemente determinada pelo crescimento de bactérias na superfície da carne, pois o tecido interno do músculo é considerado estéril até o momento do corte. Os tipos de microrganismos deteriorantes que se desenvolvem em carnes resfriadas estão relacionados às condições de processamento e estocagem. Atualmente, na América do Norte, cerca de 85% das carnes frescas e da maioria das processadas são embaladas a vácuo ou com a utilização de atmosfera modificada, contendo um ou mais gases (GILL et al., 2005).

Em 1988, em Langford, Reino Unido, uma espécie de *Clostridium* psicrófilico foi isolada de carne bovina estufada embalada a vácuo, importada da África do Sul (DAINTY et al., 1989); posteriormente essa espécie, foi denominada *Clostridium estertheticum* (COLLINS et al., 1992). Outra espécie, *Clostridium gasigenes* (BRODA et al., 2000) também foi isolado de carnes resfriadas embaladas a vácuo. Esses microrganismos produzem grandes quantidades de gases que provocam a deterioração “blown pack”. Esta é caracterizada por provocar estufamento da embalagem em função de uma abundante produção de gás, induzindo a completa distensão da embalagem e a produção de odores

atípicos (similar ao odor de queijo) do produto após 4-6 semanas sob temperatura de refrigeração.

Casos semelhantes foram relatados, na Nova Zelândia (BRODA et al., 1996 ab), com carnes de origem bovina, ovina e cervina, embaladas a vácuo, constituindo-se este o local onde o primeiro isolamento do microrganismo foi obtido, a partir de amostras de carne bovina importadas da África do Sul. A confirmação foi realizada por meio da técnica PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando-se como alvo uma seqüência da subunidade 16S do rDNA. Na Nova Zelândia, outras análises realizadas em carnes bovinas embaladas a vácuo, originárias da América do Norte, também revelaram a presença de *C. estertheticum* e de *C. gasigenes* (BRODA et al., 2002).

Atualmente, o problema do estufamento de embalagens de carnes *in natura* e cozida tem ocorrido em importações de diversos países europeus, da África, Estados Unidos, Canadá, Nova Zelândia e, também, no Brasil, onde têm sido relatados casos de estufamento resultante de contaminação por *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, em carnes bovinas embaladas a vácuo refrigeradas e oriundas de frigoríficos das regiões Centro-oeste e Sul (RAUCKER et al., 2005; 2006; ROSA et al., 2007).

Este problema, além dos prejuízos econômicos, causa forte impacto negativo às marcas comerciais dos produtos. Dessa forma, torna-se importante que métodos eficazes de controle desses microrganismos sejam desenvolvidos, evitando-se que a deterioração afete a qualidade da carne brasileira e o conseqüente desequilíbrio da balança comercial.

A relevância desta pesquisa fundamenta-se na carência de trabalhos sobre o tema, associada à particularidade de microrganismos anaeróbios estritos que exigem metodologia de difícil execução. Embora algumas técnicas moleculares já sejam empregadas, há a necessidade de estudos mais completos e definitivos a respeito da própria metodologia, da ocorrência, do rastreamento das fontes de contaminação, do comportamento e do controle destes microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar, isolar, rastrear e controlar *C. estertheticum* e de *C. gasigenes* em empresas produtoras de carne bovina resfriada embalada a vácuo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar, pela técnica PCR, e isolar, pela técnica cultural, *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do ambiente e em carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo - tipo exportação -, em dois matadouros-frigoríficos exportadores.
- Rastrear, pela técnica PCR-RFLP, *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do ambiente e em carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo - tipo exportação -, em dois matadouros-frigoríficos exportadores.
- Detectar, pela técnica PCR, e isolar, pela técnica cultural de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina resfriada embalada a vácuo adquirida no comércio de Campinas-SP.
- Avaliar a ação esporicida de diferentes sanitizantes sobre *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Principais microrganismos na produção de carne bovina embalada a vácuo

Os principais deterioradores da carne são os Gram negativos: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Moraxella*, e os Gram positivos *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Micrococcus* e *Streptococcus* (JAY, 1992). Entre as causadoras de toxinfecções alimentares podem ser incluídas *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (T SAKATE, 2005; VANDERLINDE et al., 1998; TECNOLOGIA, 1998).

O projeto das instalações deve seguir as normas preconizadas pelo Sistema Federal de Fiscalização (SIF) do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (MARA) ou pelas normas estabelecidas pelas coordenadorias estaduais ou municipais de inspeção animal. A complexidade de exigências é maior em nível federal, visto que somente um estabelecimento com SIF é habilitado para exportação de produtos de origem animal. A seguir, estão descritas as principais áreas e os principais microrganismos contaminantes em diferentes etapas do abate e locais de matadouros-frigoríficos de bovinos (CODEX ALIMENTARIUS, 1994).

3.1.1 Criação

As infecções no animal em vida podem levar à contaminação dos tecidos internos, principalmente se o agente de contaminação espalha-se na corrente sanguínea. Do mesmo modo, além das infecções, e determinadas situações de “estresse” e de má alimentação podem provocar migração de microrganismos através da parede intestinal. Isto pode levar à contaminação dos gânglios linfáticos e das vísceras por um número reduzido de microrganismos, entre os quais

poderão estar patógenos, como a *Salmonella* e esporos de clostrídios (GILL, 1996; PRENDERGAST et al. 2004).

Muitos agentes patogênicos são transmitidos ao homem através da carne, por exemplo: *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Escherichia coli*; todos só podem ser controlados com práticas corretas de produção na origem (SANDS, 1991; FRANSEN et al., 1996).

A pele, o trato gastrointestinal e o trato respiratório são os reservatórios dos microrganismos, sendo que a pele constitui a fonte primária de contaminação através do seu contato direto com as carcaças (CASTILLO, et al., 1998b).

A qualidade e a segurança microbiológica de produtos crus dependem do controle desenvolvido durante a produção, preparação, armazenamento e apresentação para comercialização. Produtos de origem animal estão sujeitos à contaminação microbiana a partir de várias fontes, sendo que o próprio animal contribui com microrganismos patogênicos ou deteriorantes (BELL, 1997). Outras fontes de contaminação podem ocorrer por meio da água, instalações, equipamentos e manipuladores (CASTILLO, et al., 1998ac). É necessário conhecimento das prováveis fontes de contaminação e dos diferentes meios de transmissão para que seu controle seja maximizado e os microrganismos sejam excluídos sempre que possível (BROWN et al., 1997).

Avery et al. (2004) estudaram, em matadouro-frigorífico exportador, 51 (cinquenta e uma) cepas de *E. coli* O₁₅₇:H₇ isoladas em criação de gado, fezes e carcaças. Verificaram que a contaminação cruzada era um grave problema, pois através dos bovinos, microrganismos originários do campo eram conduzidos para dentro das instalações e superfícies dos equipamentos da indústria. Destacaram, também, que os principais meios para o controle das contaminações microbiológicas no campo consistem na aplicação das boas práticas agropecuárias.

3.1.2 Transporte do animal

O transporte dos animais vivos, da propriedade rural ao matadouro-frigorífico, ainda que de baixo risco para a higiene da carne, exige práticas para prevenir a transmissão de doenças de um animal para outro (REID et al., 2002). Essas medidas de higiene começam pela seleção dos animais sadios, limpos e com jejum hídrico alimentar. As operações de carga e descarga deveram ser realizadas com cuidado para evitar “estresse” ou contusões nos animais (GRANDIN; 1997).

Os transportes difíceis e penosos, em circunstâncias especiais, podem ocasionar “estresse” no animal e, assim, as substâncias metabólicas que se formam podem atravessar a barreira intestinal, prejudicando as condições normais da carne. Por idêntico mecanismo, microrganismos saprófitos e patogênicos, presentes no intestino, ultrapassam as paredes do mesentério e atingem o sangue e os músculos. A fadiga causada ao animal pelas condições inadequadas de transporte, quando enviado diretamente ao corte, produz ainda alterações no ciclo do glicogênio e a conseqüente formação de ácido láctico, que interfere no processo de maturação da carne (RIEDEL, 1992; BROOM & MOLENTO, 2004). Outro dado importante consiste no tempo em que os animais permanecem em trânsito ou alojados nos matadouros-frigoríficos; por exemplo, a prevalência de infecções por *Salmonella* aumenta quando o transporte e a permanência em currais de matadouros-frigoríficos ocorrem durante períodos prolongados (SMALL et al., 2002).

Os veículos destinados ao transporte de animais devem ser constituídos para reduzir ao mínimo a contaminação cruzada, sendo que os matadouros devem dispor de meios que permitam assegurar sua limpeza e desinfecção (ROÇA & SERRANO, 1994; 1995).

Um amplo estudo avaliou os fatores de risco associados à contaminação da pele e das carcaças de bovinos provenientes de confinamento e de pastagem, durante o transporte para o abate. Da totalidade de 1050 (mil e cinqüenta)

amostras do reto, pele e ambiente (antes e após o transporte) e da carcaça (após o abate), foram obtidas 281 (duzentos e oitenta e uma) amostras positivas para *Salmonella*. Para bovinos em confinamento, *Salmonella* foi isolada de 19% das carcaças; sendo 4% das amostras do reto, 37,5% da pele e 47,4% do ambiente. Para bovinos em pastagens, *Salmonella* foi isolada de 54,2% das carcaças; sendo 10,9% das amostras do reto, 37,5% da pele e 50% do ambiente. Os bovinos em pastagens obtiveram amostras com uma percentagem maior de isolamento de *Salmonella* em comparação aos bovinos em confinamento, com exceção da pele, que apresentou percentagem equivalente (BEACH et al., 2002ab).

3.1.3 Abate

Os métodos usualmente empregados no abate de animais podem favorecer a inoculação de microrganismos nos tecidos; porém, o uso de práticas higiênicas (higienização de facas entre um abate e outro), pode evitar esse risco (ROÇA et al., 2002).

A contaminação da carne, durante o abate, poderá ocorrer no ato da introdução do instrumento perfurante no corpo do animal e na conseqüente sangria, operação importante por seu aspecto higiênico-sanitário e comercial, devendo ocorrer imediatamente após o processo de insensibilização. A sangria deverá ser executada em animais suspensos por dispositivos aéreos, de modo a evitar contato com microrganismos do solo. O sangue deve ser removido completamente o mais rápido possível, pois se trata de excelente meio de cultura, oferecendo condições favoráveis ao crescimento, à multiplicação de microrganismos (principalmente os responsáveis por processos de deterioração) e a sua distribuição pela carcaça (LAMBERT et al., 1991; JONES et al., 2004).

A sangria aumenta a capacidade de trabalho do coração e torna mais intensa a circulação, resultando em fibrilação ventricular e parada cardíaca. Com isso, microrganismos presentes na região do local da sangria e no tubo digestivo do animal são transportados por todo o corpo. É também possível que, durante a

agonia, ocorra contaminação da carne devido a maior saída de líquido das membranas e dos capilares, pois esses ficam com a permeabilidade aumentada, favorecendo a passagem dos microrganismos para os tecidos. Os principais microrganismos intestinais que podem atingir os músculos, através do sangue, são: *Clostridium perfringens*, *Salmonella sp*, *Streptococcus bovi*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus durans* (GILL et. al, 1998).

Hakkinen et al. (2007) investigaram a prevalência de *Campylobacter* spp. em gado finlandês no momento do abate e a contaminação da carcaça após o abate. Durante todo o ano de 2003, foram examinadas amostras fecais (n = 952) e superfícies de carcaças (n = 948) de 12 (doze) de 15 (quinze) matadouros-frigoríficos finlandeses. No total, *Campylobacter* sp. foram detectados em 31,1% das amostras fecais e em 3,5% das carcaças. *Campylobacter jejuni* foi isolado de 19,5%, *Campylobacter coli* de 2,2% e *Campylobacter hyointestinalis* de 10,8% das amostras fecais.

A incidência de quatro bactérias patogênicas foi investigada em gado bovino de corte, no momento do abate, na Irlanda do Norte. Fezes foram coletadas *post mortem* do gado de corte (n = 220) em sete matadouros-frigoríficos. *Campylobacter* spp. foram encontrados em 52 (cinquenta e duas) amostras (24,8%), *L. monocytogenes* em 10 (4,8%), *E. coli* O157: H7 em 02 (0,9%), enquanto *Salmonella* spp. foram isoladas a partir de 06 (seis) de 200 (duzentas) amostras (3,0%). *Campylobacter* spp. foram mais frequentemente isoladas, apesar de serem relativamente raras na carne (MADDEN, 2007).

3.1.4 Esfolia

A esfolia é uma etapa de alto risco de contaminação devido à elevada presença microbiana na superfície da pele, que pode incluir diversos microrganismos tanto patogênicos como deteriorantes (BACON et al., 2000).

A pele é a maior fonte de contaminação das carcaças (SHERIDAN 1998), e a presença de fezes na pele é importante fonte de patógenos em carcaças

(ROBERTS, 1992; EUSTACE et al., 2007). A população de microrganismos localizada na pele é composta de uma flora residente representada pelos gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *L. monocytogenes* e por leveduras provindas do ambiente (solo, pasto, fezes), ressaltando-se que, em épocas frias, os microrganismos psicrotróficos encontram-se em maior proporção (ICMSF, 1997; VAN DONKERSGOED et a., 1997).

A pele apresenta contagens (\log_{10} UFC/cm²) de 5,0 a 9,0 de aeróbios mesófilos, 3,0 a 6,0 de *Enterobacteriaceae*, 1,0 a 5,0 de *E. coli*, 5,0 a 6,0 de esporos de bacilos, 1,0 a 3,0 de fungos e 6,6 de *Salmonella dublin*. A população microbiana da pele dos animais, no momento do abate, depende de uma série de fatores, tais como: local de produção, método de transporte e condições do estábulo no matadouro-frigorífico (NORTJÉ, 1990; ROÇA e SERRANO, 1994).

A contaminação dos animais, em épocas de chuvas, é diferente da que ocorre em períodos de secas. Newton et al. (1978) observaram, na Nova Zelândia, onde as menores temperaturas coincidem com o maior índice pluviométrico, uma correlação positiva da contagem de psicrotróficos com as chuvas e uma negativa com a temperatura. Assim, a contagem total e a contagem de psicrotróficos da pele foi maior no inverno (4,6 e 2,5 log UFC/cm², respectivamente) e menor no verão (3,8 e <1,0 log UFC/cm²). Segundo os mesmos autores, a ocorrência de *Brochothrix thermosphacta* foi maior no outono e menor no verão.

Ridell e Korkeala (1993) relataram que a presença de material fecal sobre a pele do animal vivo é uma importante indicação dos níveis de contaminação de carcaças, permitindo que *E. coli* O157:H7 e outros microrganismos entéricos passem das fezes para a pele, podendo ser transferidos para a carcaça durante o abate.

Reid et al. (2002) determinaram a presença de patógenos entéricos em 90 (noventa) amostras de pele bovina, através da técnica de esponja. *E. coli* O157:H7 foi encontrada nas regiões da alcatra e do peito, respectivamente, em 3,3% e 22,2% das amostras; *Salmonella* spp. foi detectada nas regiões da alcatra e do

peito, respectivamente, em 2,2%, e 10,0% das amostras. A contaminação da pele de bovinos por material fecal leva à contaminação de carcaças por patógenos entéricos durante o processo de esfolagem.

3.1.5 Evisceração

O trato intestinal é a segunda maior fonte de patógenos e deteriorantes durante o processo de abate. Assim, a evisceração deve ser cuidadosa, com o objetivo de minimizar a contaminação da carcaça, evitando-se perfurações no trato gastrintestinal (GILL, 1994; BELL, 1997).

No momento do abate, o rúmen pode conter (log UFC/g) 6,0 a 8,0 de aeróbios mesófilos; 2,0 a 5,0 de psicrotóxicos; 3,0 a 7,0 de *E. coli* e *Enterobacteriaceae* e 3,0 de *Salmonella*. As fezes podem conter (log UFC/g) 7,0 a 9,0 de aeróbios; 2,0 a 5,0 de psicrotóxicos; 6,0 a 9,0 de *E.coli* e *Enterobacteriaceae*; em torno de 6,0 de *C. perfringens* e 4,0 a 5,0 de *Salmonella* (ROÇA & SERRANO, 1995).

Bailey et al. (2003) realizaram um estudo em fezes de 475 (quatrocentos e setenta e cinco) bovinos e ovinos e encontraram espécies de *Campylobacter* (*C. jejuni* e *C. coli*); sendo isolados 6% para gado leiteiro, 24% para gado de corte confinado, 58% para bovinos de pasto e 22% para carneiros e ovinos. *Listeria ivanovii* foi isolada a partir de uma vaca leiteira.

3.1.6 Lavagem

A etapa de lavagem pode disseminar a contaminação e contribuir para a formação de aerossóis, sendo comum o uso de substâncias bactericidas. Segundo JERICHO et al. (1993), é muito pequena a eficiência da lavagem das carcaças; não significando, portanto, um maior período seguro de estocagem. Além disso, a lavagem excessiva das carcaças poderá resultar em excesso de umidade,

dificultando a sua desidratação superficial durante a estocagem e aumentando os riscos de deterioração pela microbiota remanescente.

Vários métodos para melhorar a eficiência antibacteriana da lavagem foram sugeridos; inclusive, uso de água quente, nebulizações de cloro, ácido acético e ácido láctico. Dorsa et al. (1998) verificaram, durante 21 dias, o efeito de 2% (v/v) em ácido láctico, 2% (v/v) em ácido acético, 12% (p/v) em fosfato trissódico, em água a 72°C e em água a 32°C na lavagem de cortes bovinos embalados a vácuo. Os cortes foram inoculados com ($< 2 \log$ UFC/g) de *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O₁₅₇:H₇ e *Clostridium sporogenes*. Em geral, o crescimento das quatro bactérias foi suprimido ou não observado nos tratamentos com ácido láctico ou ácido acético. A água quente proporcionou pouco crescimento durante o armazenamento subsequente.

Vasconcelos et al. (2002) concluíram que o tratamento da carcaça ovina com ácido acético a 1%, seguido de embalagem a vácuo, de maturação da carne por 48 dias e de temperatura de armazenamento de 1°C, não afetou o pH e inibiu o crescimento de bactérias mesófilas, bolores e leveduras por duas semanas e o de bactérias de grupo coliformes por seis semanas.

Silva (1999) verificou que o tratamento com soluções de ácidos orgânicos reduziu em, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos a contagem total de bactérias psicrótróficas na superfície de carcaças de animais recém abatidos e armazenados a $7 \pm 2^\circ\text{C}$, mantendo-se essa redução durante 15 dias de estocagem.

3.1.7 Resfriamento

Após a lavagem as carcaças, são conduzidas para a câmara fria. Os operadores, usualmente, empurram-nas manualmente, gerando contaminações adicionais sobre elas, devido ao contato manual e através das superfícies de outras carcaças (YALÇIN et al., 2001).

No transcorrer do processo de resfriamento da carcaça, podem ocorrer variações nas espécies microbianas contaminantes. Inicialmente, há predominância de bactérias mesófilas e, durante o armazenamento sob refrigeração, há inversão para psicotróficas.

A carga microbiana da superfície de carcaças aumenta em função do tempo. Assim, informações para se manter a qualidade a uma dada temperatura podem ser obtidas através de medidas de contagens de bactérias nas superfícies (NISKANEN e POHJA, 1977). Microrganismos são introduzidos no interior das carnes como resultado da transferência de bactérias da superfície das carcaças. A microbiota inicial é diversa no momento do abate; entretanto, a refrigeração seleciona grupos limitados de espécies aeróbias psicotróficas, particularmente: *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter* (WHYTE et al., 2004; NACMCF, 1993).

Embora o desenvolvimento microbiano, de um modo geral, torne-se progressivamente mais lento à medida que a temperatura diminui, a sensibilidade à temperatura de alguns tipos de microrganismos varia consideravelmente (BUYS et al., 2000). *E. coli* multiplica-se lentamente abaixo dos 14°C, mais rapidamente entre os 30 e 44°C. Contudo, no caso das *Pseudomonas* sp., não ocorre crescimento acima dos 32°C, apresentando limites ideais de temperatura entre os 25 e 30°C e desenvolvimento possível abaixo do ponto de congelamento (GILL, 1996; DOYLE, 2002).

O grupo mais importante para a carne refrigerada é o dos microrganismos, com um limite de crescimento que se estende até o ponto de congelamento e, por vezes, até mesmo abaixo dele. Dentre eles destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp., *Clostridium botulinum* E, B, F, *Yersinia enterocolitica*, *L. monocytogenes*; *Micrococci Lactobacilli*, *Leuconostoc* sp., *B. thermospacta*, *Enterobacter* sp., *Hafnia* sp., *Klebsiella* sp., *Enterococcus*, *Penicillium*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Psychrobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Sporotrichum* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* (AHMED et al., 2002; DESMARCHELIER et al., 1999; INSAUST et al., 2001; LEE, 2001; SKANDAMIS, 2002).

3.1.8 Corte e desossa

Superfícies e equipamentos inadequadamente limpos, usados no corte e na desossa, podem representar fonte de microrganismos deteriorantes psicrotróficos. O processo favorece a disseminação e a multiplicação microbiana. Isto é crucial para a vida de prateleira da carne. Projeto, manutenção e higiene da instalação, utensílios e equipamentos são importantes. A temperatura da sala de corte deve ser mantida a 10°C ou menos. Deve ser evitado o uso de panos de esfregar, tábuas de corte em madeira e correias transportadoras absorventes (MANTIS et al., 2007).

Brightwell et al. (2006) analisaram uma comunidade bacteriana numa correia transportadora *Intralox™* presente no interior de uma sala de desossa. Foram detectadas bactérias como: *Serratia* sp., *Alcaligenes* sp., *Microbacterium* sp. e *Pseudomonas* spp.

Nell et al. (2004) verificaram a contaminação por *B. cereus.*, *S. aureus.*, *Pseudomonas* sp., *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella* spp. em carnes de uma sala de desossa do matadouro-frigorífico. A média para a contagem de *B. cereus* foi de $8,32 \times 10^3$ UFC/g; para o *S. aureus* e o *Pseudomonas* sp. foi de $1,72 \times 10^5$ e $1,7 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente; e para a *E. coli* foi de $3,4 \times 10^5$ UFC/g. Sessenta por cento das amostras foram positivas para *Salmonella* sp., enquanto que cinquenta e dois por cento das amostras testadas foram positivas para *L. monocytogenes*.

3.2 Microbiota da carne bovina embalada a vácuo

A vida útil de carne bovina *in natura* está diretamente relacionada à sua qualidade inicial, com a eficiência do sistema de embalagem e com a adequação da cadeia frigorífica nas etapas de comercialização. A extensão da vida útil dos produtos cárneos se observa através de propriedades de cor, estabilidade oxidativa e crescimento microbiano; sendo, também, influenciada pelas condições do meio ambiente em que são estocados (LEISNER, et al., 1995; KENNEDY et al.,

2004). Quanto mais adequados forem estes fatores, melhor será a qualidade do produto que chegará à mesa dos consumidores (NISHI, 2006).

A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento microbiano na carne, pois a taxa de desenvolvimento e a fase lag são altamente dependentes desse fator (WIJTZES et al., 1995; DEVLIEGHERE et al., 1998). A proporção de bactérias presentes na superfície da carcaça também depende do oxigênio disponível e da atividade de água, os quais determinam, além da quantidade, o tipo de microrganismo que cresce na carne (LABADIE, 1999; LEITÃO, 1995 e 2003).

O ponto a partir do qual a deterioração microbiana torna-se evidente depende da natureza do substrato e do tipo de organismo presente. O crescimento de microrganismos aeróbios é prevenido através dos seguintes procedimentos: embalagem a vácuo, remoção do oxigênio e produção do gás carbônico (JEREMIAH, 2001a). Contudo, a deterioração, eventualmente, desenvolve-se como consequência do crescimento de microrganismos capazes de tolerar condições anaeróbias. (JEREMIAH, 2001b).

Na carne embalada a vácuo, a microbiota presente é selecionada conforme as condições ambientais expostas (temperatura, umidade relativa, pressão parcial de oxigênio e dióxido de carbono), sendo que microrganismos anaeróbios estritos e facultativos adquirem alto potencial de crescimento nestas condições. A competição entre a microbiota inerente ao produto atua favorecendo ou inibindo certas espécies de microrganismos (KORKEALA & BJÖRKROTH, 1997; DYKES, et al., 2001).

Na microbiota na carne bovina embalada a vácuo podemos encontrar diversos microrganismos entre os quais estão *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus algidus*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus piscium*, *Leuconostoc gelidum*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Psychrobacterem* (SAKALA et al. 2002) e *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *L. fermentum* (OLIVEIRA et al. 2008)

A microbiota normalmente encontrada na carne em condições aeróbias é formada por *Pseudomonas* (GILL & NEWTON, 1978). Em um ambiente aeróbio, a degradação microbiana de carne bovina resfriada produz uma gradual elevação no pH devido à liberação de amônia após um ataque microbiano aos aminoácidos. A deterioração aeróbia torna-se evidente quando as bactérias ainda estão na fase logarítmica de crescimento, ou seja, antes que haja qualquer degradação de moléculas complexas presentes na carne (JONES, 2004).

Em condições de anaerobiose, cepas anaeróbias ou anaeróbias facultativas, tais como *Lactobacillus*, *B. thermosphacta* e *Enterobacteriaceae*, constituem a microbiota dominante. Entretanto, em muitos casos, bactérias lácticas tornam-se dominantes em embalagens a vácuo de carne bovina sob refrigeração (CAYRÉ et al., 2005).

Várias bactérias anaeróbias facultativas indesejáveis podem crescer e causar deterioração da carne fresca refrigerada embalada a vácuo. Isto pode ser causado pela bactéria *Brochothrix thermosphacta*, microrganismo anaeróbio facultativo, não esporogênico, responsável por alterações na carne, tais como: presença de limosidade, odor pútrido, descoloração de pigmento, ocorrência ou não de estufamento (PIN et al., 2002).

Em temperaturas acima de 6°C, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* podem ser um problema, visto que descarboxilam aminoácidos, produzindo aminas orgânicas, as quais têm odores e sabores pútridos. *Shewanella putrefaciens*, que preferencialmente utiliza cisteína para produzir sulfeto de hidrogênio e sulfetos orgânicos, pode crescer sob estas condições e contribuir para a deterioração. Os sulfetos produzidos causam odores muito desagradáveis e podem também reagir com a mioglobina e produzir coloração verde na carne. *Aeromonas* spp., que são anaeróbias facultativas, podem produzir H₂S e têm sido responsabilizadas pela deterioração de carne suína de elevado pH embalada a vácuo e armazenada a -1,5°C (SAKALA et al., 2002; HOLLEY et al., 2004).

Em geral, a deterioração da carne resfriada acondicionada a vácuo pode ser relacionada à elevação da temperatura durante o armazenamento, podendo ou não ser observado estufamento da embalagem. Espécies da família *Enterobacteriaceae*, como *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes* e *Hafnia alvei*, têm sido, em números significativos, isoladas de carnes embaladas a vácuo com estufamento, após ter sido constatado o abuso da temperatura de estocagem (NISSEN et al., 1996; SERDENGECTI et al., 2006).

A ocorrência de estufamento em carnes embaladas a vácuo, sem a constatação do aumento da temperatura de condicionamento, pode estar associada à presença de *Clostridium* sp. psicrotróficos e psicrófilos (DAINTY et al., 1989). Os microrganismos psicrófilos têm temperatura de multiplicação entre 0°C e 20°C, com um ótimo entre 10°C e 15°C; já os p sicrotróficos têm a capacidade de se desenvolver entre 0°C e 7°C (FRANCO & LANDGRAF, 2001). Dentre as espécies constituintes deste grupo de microrganismo, destacam-se: *C. estertheticum* (COLLINS et al., 1992), *C. gasigenes*, *C. laramie* (KALCHAYANAD, 1993) e *C. algidicarnis* (LAWSON et al., 1994).

A maioria dos patógenos psicrotróficos associados à carne (*L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia enterocolitica*) são inibidos pelo CO₂ no pH normal de carne fresca (GILL, 2005). Em valores mais altos de pH, tais como em tecido muscular DFD (Dark, Firm and Dry), algum crescimento de patógenos psicrotróficos pode ocorrer, a não ser que seja usada atmosfera controlada com CO₂ em alta concentração.

Um perigo que está associado às carnes sob atmosfera modificada é em relação à produção de toxina pelos *C. botulinum* tipo E, F e B não-proteolítico, que podem crescer a 3°C (RAVEENDRAN et al., 1993; CHURCH e PARSONS, 1995).

Plaatjies et al. (2004) observaram que todas as amostras de carnes bovinas embaladas a vácuo, coletadas na sala de desossa de um matadouro-frigorífico, armazenadas à temperatura de 18°C apresentavam sinais precoces (48 horas) de proliferação microbiana. Foram identificadas *Staphylococcus aureus*,

S. epidermidis; *S. hominis*; *S. lugdunensis*; *S. intermedius* e *S. xylosum*, espécies estas normalmente associadas à pele humana e ao ambiente oral, bem como *S. cohnii* associada às infecções urinárias. Os resultados indicaram a falta de higiene dos manipuladores do matadouro-frigorífico.

Nissen et al. (1996) pesquisaram o comportamento da microbiota de carnes embaladas a vácuo, sob diferentes condições de atmosfera (O₂, CO₂ e N₂) e temperatura (-1, -2, 2 e 6°C) e observaram a inibição do crescimento bacteriano, especialmente de *Pseudomonas* e de *Brochothrix thermosphacta*, tanto a elevada concentração de CO₂, como a baixa temperatura de armazenamento.

3.3 *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*

3.3.1 Caracterização de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Os clostrídios psicrófilos e psicrótrófos, *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* têm sido identificados como agentes causadores de deterioração “blown-pack” em carne resfriada embalada a vácuo durante estocagem a temperaturas de -1,5 a 2°C (DAINTY et al., 1989, BRODA et al., 2000).

Clostridium estertheticum é caracterizado como um microrganismo anaeróbio, gram-positivo, formador de esporos, psicrófilo e isolado de carne embalada a vácuo refrigerada (COLLINS et al., 1992). As suas células possuem o formato de bacilos e ocorrem isoladamente, em pares ou em pequenas cadeias (**Figuras 1 e 2**). São móveis e apresentam flagelos peritríqueos. Os endosporos são elipsóides e localizados, geralmente, na posição subterminal; porém, algumas vezes podem estar na posição central ou terminal, sendo que os esporângios são ligeiramente estufados. As colônias em ágar sangue possuem 1-2 mm de diâmetro, são redondas, lisas, ligeiramente elevadas; sua coloração varia de creme-branco para acinzentado e de semi-transparente para opaco. O pH para o desenvolvimento ótimo é em torno de 6,5.

Esta espécie é capaz de utilizar os seguintes carboidratos: arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, inositol, inulina, maltose, manitol, manose, melobiose, rafinose, raminose, sorbitol, amido, sacarose e xilose. Os produtos da fermentação são: butarato, acetato, lactato, formatato, 1-butanol, etanol, hidrogênio e dióxido de carbono. A maioria dos ácidos graxos produzidos são C_{14:0}, C_{16:1} e C_{16:1}. O conteúdo G + C (guanina e citosina) do DNA, de cada célula, é de 32.4-33.9 mol% (HPLC). O *C. estertheticum* pode ser classificado em duas subespécies: *C. estertheticum* subsp. *laramiense* e *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (SPRING et al., 2003).

A descrição original de *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* foi realizada por Kalchayanand et al. (1993). Sua morfologia consiste em bacilos, ocorrendo isoladamente ou em pequenas cadeias. Os esporos são ovais e terminais (**Figura 1**). As colônias em ágar sangue são lisas, convexas, de cor creme-branco para acinzentadas. Crescem em pH 4.5 a 7.5, sendo que o ótimo constitui-se em torno de 6.5. A temperatura de crescimento é de -3 a 21°C, com ótimo em 15°C. São capazes de fermentar carboidratos, tais como: glicose, frutose, galactose, maltose, melobiose, raminose, rafinose, manitol, inositol e gluconato. Entretanto, não fermentam lactose, celobiose, arabinose, ribose, trilose, xilose e inulina. Ao contrário da descrição original, Spring et al. (2003) verificaram que o *C. estertheticum* subsp. *laramiense* é capaz de fermentar arabinose, celobiose e xilose, distinguindo-se da subespécie *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* pelas seguintes características: são β-hemolíticas, a temperatura ótima de crescimento é de 15°C, com limite máximo de 21°C, o pH para crescimento é de 4,5 a 7,5 com ótimo a 6,5, o glicogênio é utilizado em caldo PYG, a fermentação não gasosa tem como produtos finais o butirato, 1-butanol e lactato, sendo que o conteúdo de G+C de cada cepa é de 32,4 mol% (HPLC).

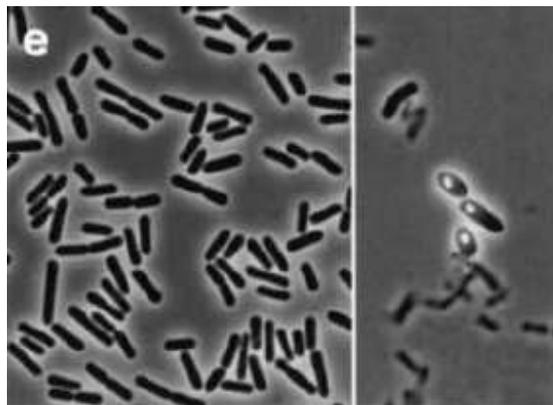


Figura 1. Fotomicrografia de contraste de fases de células vegetativas (esquerda) e esporos (direita) de *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense*
Fonte: SPRING et al., 2003.

Em relação ao *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (**Figura 2**), tem-se que as principais características que o tornam distinto de *C. estertheticum* subsp. *laramiense* são: ausência de hemólise; temperatura ótima de crescimento de 6-8°C, com limite máximo de 13°C; o intervalo de pH para desenvolvimento é de 5,5 –7,8 (ótimo 6,5-7,2); o glicogênio não pode ser utilizado; em caldo PYG, a mais abundante fermentação não gasosa tem como produtos finais ácidos graxos voláteis, sendo que o conteúdo de G+C de cada cepa é 33,9 mol% (HPLC) (SPRING et al., 2003).

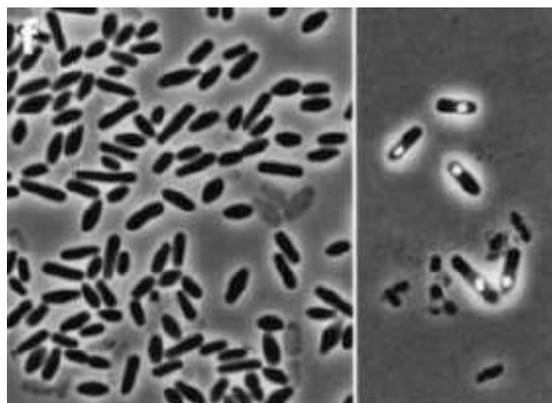


Figura 2. Fotomicrografia de contraste de fases de células vegetativas (esquerda) e esporos (direita) de *Clostridium estertheticum* subsp. *estertheticum*
Fonte: SPRING et al., 2003.

Clostridium gasigenes é um microrganismo psicrotrófico isolado de carne embalada a vácuo que cresce na faixa de -1,5 a 26°C (ótimo: 20-22°C) (**Figura 3**). As colônias em ágar sangue possuem 0.7-3.0 mm de diâmetro e são circulares, brancas para cinzas, convexas, brilhantes e β-hemolíticas, móveis, produzindo esporos elípticos subterminais durante a fase estacionária (**Figura 3**). A faixa de pH fica entre 5.4-8.9, com ótimo de crescimento entre 6,2 e 8,6, hidrolisam gelatina e amido, fermentam celobiose, frutose, glicose, inositol, maltose, manose, salicina e trelose. Os produtos formados na fermentação em caldo PYGS são: etanol, acetato, butirato, lactato, butanol, dióxido de carbono e hidrogênio. O conteúdo de G+C de cada cepa é de 28.3-29.4 mol% (HPLC) (BRODA et al., 2000).

Pode-se observar, nas **Tabelas 1 e 2**, a comparação entre algumas características bioquímicas e os fatores intrínsecos e extrínsecos do *C. estertheticum* subsp. *estertheticum*, *C. estertheticum* subsp. *Laramiense* e dos *C. botulinium* B, E, F.

Tabela 1. Principais fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o desenvolvimento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

| <i>Características</i> | <i>C.estertheticum</i> <i>subsp. estertheticum</i> | <i>C.estertheticum</i> <i>subsp. laramiense</i> | <i>C. gasigenes</i> |
|-------------------------|---|--|---------------------|
| pH: | | | |
| mínimo | 5,5 | 4,5 | 4,5 |
| ótimo | 6,5 – 7,2 | 6,5 | 5,4 – 8,6 |
| máximo | 7,8 | 7,5 | 8,9 |
| Temperatura (°C) | | | |
| mínima | - 3 | - 3 | - 1,5 |
| ótima | 6 – 8 | 15 | 20-22 |
| máxima | 13 | 21 | 26 |

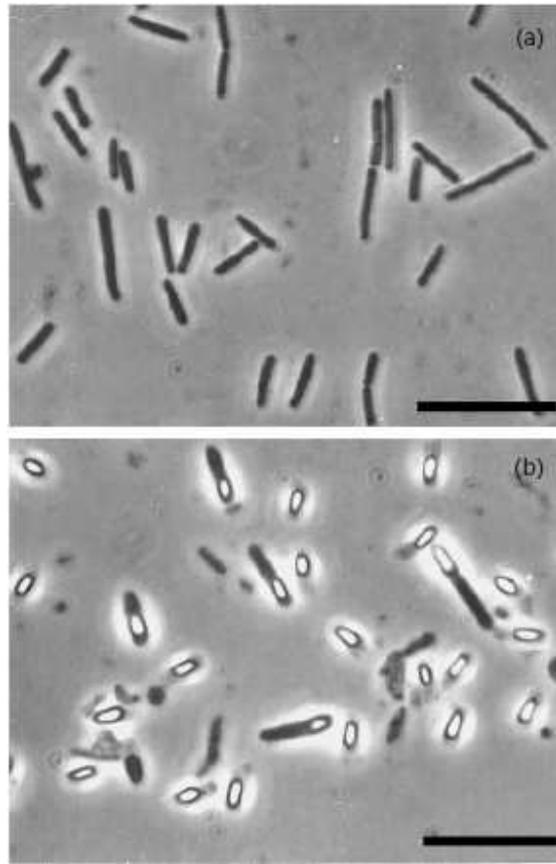


Figura 3. Fotomicrografia de contraste de fases de células vegetativas (a) e esporos (b) de *C. gasigenes*
Fonte: SPRING et al., 2003.

Tabela 2. Algumas características bioquímicas de clostrídios psicrófilos e psicrotróficos

| Características | <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i> | <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i> | <i>C. gasigenes</i> | <i>C. botulinum</i> tipos E, B e F não proteolíticos |
|------------------------------|--|---|---------------------|--|
| Hidrólise de gelatina | + | + | + | + |
| Fermentação de: | | | | |
| • Arabinose | + | + | * | - |
| • Glicose | + | + | + | - |
| • Manose | + | + | + | - |
| • Frutose | + | + | + | - |
| • Sacarose | + | + | * | - |
| • Lactose | - | - | - | - |
| • Melobiose | + | + | * | - |
| • Xilose | + | + | - | - |
| • Galactose | + | + | * | - |
| • Inositol | + | + | + | - |
| • Maltose | + | + | + | - |
| • Manitol | + | + | * | - |
| • Manose | + | + | + | - |
| • Raminose | + | + | * | - |
| • Sorbitol | + | + | * | - |
| • Xilose | + | + | + | - |
| • Trellose | + | + | * | + |
| Produção de: | | | | |
| • Ácido acético | + | + | + | + |
| • Ácido butírico | + | + | + | + |
| • Ácido fórmico | + | + | + | - |
| • Ácido láctico | + | + | + | + |
| • Etanol | + | + | + | - |
| • Butanol | + | + | + | - |
| β-hemolítico | + | - | + | - |

Adaptado de SPRING et al. (2003)

3.3.2 Deterioração “blown-pack”

A deterioração “blown-pack” é caracterizada por provocar estufamento em embalagens de carnes refrigeradas embaladas a vácuo, pela abundante produção de gás, induzindo completa distensão da embalagem durante o processo de estocagem sob refrigeração. Ao abrir-se a embalagem, um odor atípico do produto (similar ao odor de queijo) é liberado. O gás presente na embalagem é composto por dióxido de enxofre e hidrogênio, além de vários compostos butíricos do metabolismo fermentativo (JONES & WOODS, 1986; BRODA et al., 1997).

Em 1989, Dainty et al. realizaram um estudo com carnes embaladas a vácuo, sob refrigeração, que apresentavam deterioração e embalagens distendidas. A análise da composição gasosa no *headspace* das embalagens deterioradas acusou a presença, em maior concentração, dos gases hidrogênio e dióxido de carbono. Outros componentes também foram detectados, como: metametilol, sulfeto dimetil, trimetil e trissulfeto, metiltioacetato, 1-butanol, ácidos butanóico e acético e éster 1 butil.

Os grandes causadores da deterioração “blown-pack” são os clostrídios, especialmente os *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, que vêm ocasionando graves problemas na qualidade de carne *in natura* (tipo exportação) e, também, de carne cozida, em diversos países europeus, África, Estados Unidos, Canadá, Nova Zelândia e, inclusive, no Brasil. Na **Figura 4** está representada uma foto de deterioração “blown-pack” em carne bovina embalada a vácuo, onde foi detectado *C. estertheticum*.

Na Nova Zelândia, recentes investigações de deterioração “blown-pack” em carnes a vácuo refrigeradas têm encontrado, na microbiota, número moderado a elevado de Enterobacteriaceae; porém, não têm encontrado clostrídios, como *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, que são normalmente associados ao estufamento das embalagens.

Brightwell et al. (2007) mostraram que Enterobacteriaceae psicotolerantes em carne de cordeiro em condições anaeróbicas produzem gás, podendo causar “blown-pack” em carnes refrigeradas embaladas a vácuo a 4°C durante 21 dias. Uma significativa produção de gás foi observada com a maioria das linhagens de Enterobacteriaceae psicotolerantes, incluindo espécies de *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* e *Rahnella*. No entanto, não houve a produção de gás em carnes inoculadas com espécies de *Ewingella americana* ou de *Yersinia enterocolitica*.



Figura 4. Carne bovina embalada a vácuo com deterioração “Blown-pack”, ocasionada por *C. estertheticum*

3.3.3 Isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

O reconhecimento de clostrídios psicrotolerantes como causadores de deterioração no interior de tecidos musculares e na superfície de equipamentos e de utensílios tem sido insuficiente. Dentre diversos fatores, destaca-se a dificuldade no isolamento de cepas a partir de amostras contaminadas, em número que indique proliferação e metabolismo ativo. Além disso, em meios convencionais de subcultura podem ocorrer baixa recuperação ou completa inibição de clostrídios psicrotróficos e psicrofílicos (KALCHAYANAND et al., 1993; BRODA et al., 1996b).

A grande diversidade de espécies existentes de clostrídios psicrofílicos e psicrotróficos relacionados à deterioração de carne resfriada e embalada a vácuo, assim como a escassez de estudos sobre essa problemática, acabam tornando-se fatores que dificultam a assimilação do melhor meio ou tecnologia de identificação, isolamento e quantificação desses microrganismos.

Broda et al. (1996a) obtiveram isolamento de *Clostridium* sp. psicrotolerantes de carne de carneiro embalada a vácuo através da metodologia de enumeração de microrganismos formadores de esporos em meio SPF (Tryptone Sulfite Polymyxin Agar) incubados a 15°C por três semanas com aplicação de choque térmico nas diluições.

Broda et al. (1996 b) obtiveram isolamento de clostrídios causadores da deterioração "blown-pack" em carnes bovina e ovina embalados a vácuo sob refrigeração através de duas metodologias na primeira, diluíram o exsudado em água salina pré-reduzida; posteriormente, plaquearam em ágar RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) pré-reduzido e incubaram por três semanas a 15°C. Na segunda metodologia, realizaram um pré-enriquecimento em caldo RCM por cinco dias a 15°C e, posteriormente, plaquearam em ágar RCM pré-reduzido e incubaram por três semanas a 15°C.

Em 1998, Broda et al. verificaram que, para os clostrídios com crescimento ótimo entre 15 e 20°C, o melhor meio não seletivo era PYGS (*peptone, yeast,*

glucose, starch) e ágar com lisozima e que o desenvolvimento dos esporos - após tratamento térmico (80° por 10 minutos) – teve como melhor meio o tratamento com tioglicolato (10 minutos a 45°C) seguido por plaqueamento em meio contendo lisozima ou gema de ovo. Para o crescimento dos clostrídios com ótimo entre 25 e 30°C, o melhor meio seletivo era o ágar *Shaidi Ferguson Perfringens* (SFP) e o desenvolvimento dos esporos foi melhor em ágar amido glicose, sem adição de lisozima. Em outro trabalho Broda et al (1998) observaram que, para os esporos com alta resistência térmica, o tratamento de 60 minutos com etanol foi o máximo suportado por este tipo de esporos, enquanto que o melhor método de recuperação foi o tratamento a 80°C por 10 minutos.

Posteriormente os mesmos autores (BRODA et al. 2003) obtiveram o isolamento de *C. estertheticum* e de *C. gasigenes* em amostras de piso, superfícies de equipamentos, couro e fezes provenientes de diferentes matadouros-frigoríficos, utilizando, como metodologia, a inoculação da amostra em caldo PYGS pré-reduzido a 4°C, por três semanas, em anaerobiose. Após, o caldo enriquecido foi estriado em CBA, com sangue e incubado em anaerobiose por mais três semanas a 10°C.

3.3.4 Métodos moleculares para identificação e caracterização de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

A aplicação de técnicas moleculares tem se mostrado uma alternativa rápida e específica para detecção de *C. estertheticum* e de *C. gasigenes*, sem a necessidade de métodos convencionais de isolamento. Neste sentido, técnicas como PCR (*Polymerase chain reaction*) e RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) têm se apresentado como importantes ferramentas na identificação desses microrganismos (BRODA et al., 2003).

Em 1999, Helps et al. verificaram métodos de PCR para detectar *C. estherteticum* em matadouros-frigoríficos, com o objetivo de usá-los como medida de controle de contaminação dos mesmos. O melhor resultado obtido foi

utilizando os *primers revised forward e revised reverse* com uma temperatura de anelamento de 60°C, produzindo um produto de 641 pb.

Broda et al. (2000 b) aplicaram a técnica RFLP, de análise genômica de DNA (DNA-RFLP) e de reação em cadeia da polimerase com amplificação do gene 16S rDNA (PCR-RFLP), para diferenciação entre cepas (de referência e isoladas de carne) de clostrídios psicrófilos e psicrótrófos. A partir de 22 cepas de carne, foi possível a produção de 8 genótipos distintos. Através do RFLP, observou-se que 15, das cepas isoladas da carne, foram similares a 1 ou 2 das sete cepas de referência usadas. Assim a análise de RFLP permitiu a diferenciação das espécies de clostrídios psicrótrófos e psicrófilos. Em 2002, Broda et al. (2002b) utilizaram novamente a técnica RFLP e de análise do gene 16S rDNA (PCR-RFLP) com o objetivo de diferenciar clostrídios psicrótrófos e psicrófilos causadores de “blown-pack” em carne bovina resfriada embalada a vácuo, isolados a partir de couros, fezes, amígdalas e ambientes da planta de processamento de matadouros-frigoríficos. Através do PCR-RFLP, foi possível a divisão dos isolados em dois grupos. Os clostrídios do Grupo I apresentavam similaridade com o padrão de *C. gasigenes*, sendo que a produção de gás em embalagens inoculadas com células vegetativas foi evidente, pela primeira vez, após 14 dias a 2 °C. Neste grupo, as cepas foram encontradas nos porões dos matadouros-frigoríficos e nas amostras fecais; porém, estes microrganismos estavam ausentes nas amígdalas e nas amostras ambientais da planta de processamento. No grupo II observou-se similaridade com padrão *C. estertheticum* isolados das cepas de carne. A maioria dos clostrídios deste grupo foram encontrados nas fezes; no entanto, não produziram gás em embalagens a vácuo armazenadas a 2° C durante 84 dias.

Broda et al. (2003a) desenvolveram um método de detecção por PCR diretamente na amostra, sem necessidade do isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*. A sensibilidade de detecção foi avaliada em meio não-enriquecido, sob baixas temperaturas de incubação e em carnes embaladas a vácuo

inoculadas intencionalmente com diferentes populações de culturas puras de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*. Foi possível detectar uma população mínima 10^4 UFC/g para o meio não-enriquecido e de 10^2 UFC/g para as amostras de carne inoculadas com *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

Broda et al. (2003b) realizaram um estudo sobre a diferenciação molecular de clostrídios psicrófilos e psicrótróficos, através da técnica ITS (*internal transcribed spacer*) e verificaram que os isolados apresentaram várias bandas e que o número e a dimensão dos produtos de ITS não poderiam ser utilizados para a diferenciação de *C. laramiense*, *C. estertheticum*, *C. putrefaciens*, *C. algidicarnis*, *C. frigidicarnis* e cepas não-proteolíticas de *C. botulinum* tipo B. Assim não foi possível a utilização desta técnica na discriminação e identificação dos clostrídios psicrófilos e psicrótróficos associados à carne com deterioração “blown-pack”.

3.3.5 Ocorrência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Em Langford, Reino Unido, uma espécie de *Clostridium* psicrófilo foi isolada de um pacote – importado da África do Sul - de carne bovina estufada embalada a vácuo, vindo a ser denominada *Clostridium estertheticum*. Casos semelhantes foram relatados, em Nova Zelândia, com carnes bovina, ovina e cervina embaladas a vácuo (BRODA et al., 1996ab); ocorrendo, posteriormente, a confirmação do isolamento de *C. estertheticum* (BRODA et al., 2000a) e de *C. gasigenes* (BRODA et al., 2000b).

Em 2001, Brambilla et al. isolaram e constataram que a espécie dominante de anaeróbios, em amostras de lagos, lagoas e sedimentos da região de Lake Frykell, McMundo Dry Valleys (Antártica), foi a de *Clostridium estertheticum*. A presença deste microrganismo, como microbiota dominante de anaeróbios, na comunidade do ecossistema microbiano da Antártica já havia sido constatada por Bowman et al. (1999).

Boerema et al. (2003) realizaram rastreamento *C. estertheticum* e *C. gasigenes* nos locais de abate e de processamento de carne embalada a vácuo resfriadas. Estes microrganismos foram detectados em porções dos matadouros-frigoríficos, solos e amostras fecais, bem como em amostras recolhidas, no momento do abate, de locais associados à movimentação de animais e de carcaças, antes da remoção do couro. Os dados indicam que o couro, por si, ou as partículas do solo/material fecal são os mais prováveis reservatórios de clostrídios causadores de “blown-pack” em frigoríficos.

Raucker et al. (2006) analisaram 935 amostras provenientes de matadouros-frigoríficos localizados em Goiás, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Pará, Minas Gerais e Bahia e obtiveram 149 amostras positivas para *C. estertheticum*, sendo que 27 de 230 amostras foram encontradas em meias-carcaças e que 27 de 193 amostras de cortes comerciais. Para amostras de ambientes de desossa, os autores verificaram a presença de *C. estertheticum* em 24 de 131 amostras de ralos de desossa, em 12 de 63 amostras do rolete da esteira da desossa, em 9 de 75 amostras da superfície da esteira de desossa e em 50 de 243 amostras de ambiente e de equipamentos de câmara fria.

Ponde et al. (2006) investigaram a microbiota intestinal normal de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e verificaram, por meio da técnica RFLP, que *Clostridium gasigenes* mostrou-se dominante.

Rosa et al. (2007) detectaram os locais de contaminação por *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, através da técnica PCR, na linha de processamento de carne bovina embalada a vácuo em matadouros-frigoríficos exportadores do Brasil, localizados no estado de São Paulo (A) e de Mato Grosso (B). Constataram a presença de *C. estertheticum* no ralo da câmara fria e no ralo da sala de desossa do matadouro-frigorífico “A”, e nas fezes coletadas do curral e na superfície da serra de corte das carcaças no matadouro-frigorífico “B”. O *C. gasigenes* não foi detectado.

Oliveira (2007) detectaram a presença de *C. estertheticum* em 11/32 (34,4%) das amostras de leite cru e em 17/95 (17,9%) em queijos parmesão e provolone provenientes de diferentes regiões do Brasil. Quando se considerou o estado de conservação, o queijo parmesão normal apresentou 3/18 (16,7%) amostras positivas, enquanto que no queijo com sinal de deterioração observou-se apenas 1/11 (9,1%) positiva. Por outro lado, em queijo provolone normal foram observadas 2/31 (6,4%) amostras positivas e no queijo com sinal de deterioração apenas 1/4 (25,0%) positiva. Em queijos parmesão e provolone ralados normais foram verificadas 8/27 (29,6%) amostras positivas e nos dois tipos de queijos ralados com sinais de deterioração 2/4 (50,0%) positivas.

3.3.6 Controle de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Existem poucas referências em relação ao controle de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, uma vez que existem poucos estudos em relação ao isolamento e esporulação destes microrganismo, além disso o processo de esporulação dos mesmos é muito lento sendo necessário no mínimo seis meses de incubação para produção de esporos.

Broda et al. (2007) pesquisaram o efeito de tratamentos químicos e físicos sobre a sobrevivência dos esporos de *Clostridium estertheticum*, através da utilização de quatro tratamentos, os quais incluem: calor, raios ultra-som seguido por tratamento térmico e ácido peracético seguido por tratamento térmico. Nos dois tratamentos realizados com o sanitizante observou-se redução de 4 a 5 log UFC/mL. Quando foram utilizados calor e raios ultra-som, seguido por tratamento térmico, não ocorreu a completa inativação dos esporos.

Borema et al. (2007) examinaram a influência do ácido peracético no enxágüe de carcaças em carne refrigerada embalada e artificialmente inoculada com esporos de *C. estertheticum*. O tratamento com ácido peracético na água de enxágüe gerou o retardamento do estufamento das embalagens que continham um elevado número de esporos *C. estertheticum*. A presença de, no mínimo 4

esporos por cm² de superfície, diminuiu dois terços da vida útil em carne refrigerada embalada a vácuo. O aumento do inóculo para 40 esporos por cm² resultou na aceleração do aparecimento de estufamento da embalagem. O início da produção de gás foi retardada devido ao armazenamento do produto embalado a -1,5°C em vez de a 0°C. Os resultados desse estudo indicam que o ácido peracético, usado no enxágüe, não elimina o estufamento causado pelos esporos *C. estertheticum*, mas que pode ser usado para minimizar o problema.

3.4 Principais sanitizantes utilizados em matadouros-frigoríficos

Diversos sanitizantes estão disponíveis no mercado, sendo que os mais utilizados em matadouros-frigoríficos são os compostos de hipoclorito de sódio, ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Estes sanitizantes apresentam uma comprovada eficiência sobre as formas vegetativas bacterianas nas condições recomendadas para uso nas indústrias de alimentos (MORAES et al., 1997). No entanto, em muitos procedimentos usados nas indústrias de alimentos, essas soluções sanitizantes não reduzem, até níveis considerados seguros, esporos bacterianos (MCDONNELL, G. & RUSSEL, 1999).

Os hipocloritos são os mais usados na forma de hipoclorito de sódio, o que se tem maior aplicação (TORDER, 1993). É um produto químico muito utilizado para sanificação de superfícies, equipamentos, frutas e hortaliças, água, entre outros. Sua utilização em larga escala é devido ao seu vasto espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus, além do fato de ser um produto relativamente barato (TSAI et al., 1998; EMMANUEL et al., 2004). O hipoclorito de sódio causa alterações biossintéticas no metabolismo celular e a destruição de fosfolipídios, formando cloraminas que interferem no metabolismo celular. Gera reações oxidativas com inativação enzimática irreversível em bactérias e a degradação de lipídios e ácidos graxos (ROSSONI & GAYLARDE, 2000; ESTRELA et al., 2002).

Os esporos bacterianos são mais resistentes do que as células vegetativas, o tempo requerido para reduzir 90% da população microbiana pode variar de 7 segundos a mais de 20 minutos. A quantidade de cloro livre necessária para inativar esporos de bactérias (1000 mg/L) é de 10 a 1000 vezes mais elevada do que a requerida para células vegetativas (0,6 a 13 mg/L) (MARIOTT, 1999).

Farah (2004) avaliou a eficácia de sanitizantes frente a bactérias ácido-termorresistentes isoladas do processamento de suco de laranja e verificou que a concentração mínima inibitória de hipoclorito de cloro para células vegetativas e esporos de *Alicyclobacillus* foi entre 500 e 1000 mg/L.

ODLAUG e PFLUG (1976) mostraram que soluções contendo 100 mg/L de cloro residual, em pH 8,0, a partir do hipoclorito de sódio, causou uma redução decimal na população de esporos de *Bacillus subtilis* em 60 minutos. Por outro lado, ALVARENGA et al (1991), ANDRADE e SERRANO (1993), utilizaram 105 mg/L de cloro residual, a partir do hipoclorito de sódio, em pH 8,0 a 30°C e concluíram que para obter 5 reduções logarítmicas na população dos esporos *B. subtilis* sob avaliação foi necessário um tempo de 5 minutos.

Formulações que tem ácido peracético como principio ativo são constituídas de uma mistura estabilizada de ácido peracético, contendo ainda peróxido de hidrogênio e ácido acético, além de um veículo estabilizante em equilíbrio (KITIS, 2004). Este composto é instável, sofrendo perda de 1 a 2% dos ingredientes ativos por mês, na solução a 40% e mais da metade em 6 dias, na solução a 1% (NASCIMENTO et al., 2003)

O ácido peracético é um forte sanitizante, com largo espectro de atividade antimicrobiana e usado em várias indústrias incluindo a de processamento de alimentos, bebidas, médica, farmacêutica, têxtil, de polpa e de papel. Devido às suas propriedades bactericidas, fungicidas e esporicidas, seu uso como sanitizante vem recebendo cada vez mais atenção (ALASRI et al., 1992; RAJALA-MUSTONEN et al., 1997).

O ácido peracético apresenta várias vantagens como desinfetante, com facilidade de implementação de tratamento; largo espectro de atividade, mesmo na presença de matéria orgânica heterogênea, ausência de residual ou subprodutos tóxicos e, ou, mutagênicos; baixa dependência do pH; curto tempo de contato; baixo impacto ambiental e tem sido o mais ativo contra biofilmes (SOUZA & DANIEL, 2005). Por outro lado, as maiores desvantagens associadas ao uso desse desinfetante são o aumento de conteúdo orgânico em efluentes e a baixa eficiência contra alguns vírus e parasitas (KITIS, 2004).

O provável mecanismo de ação desse sanificante pode estar relacionado com a desnaturação de proteínas e enzimas e o aumento da permeabilidade celular pela ruptura das ligações dissulfeto e sulfidrilas (McDONNELL, G. & RUSSEL, 1999)

Esporos de bactérias necessitam de 500 a 30.000 mg/L (0,05 a 3%) para uma inativação de 15 minutos a 15 segundos respectivamente, em temperatura ambiente. Assim como o peróxido de hidrogênio, o ácido peracético tem sua ação biocida influenciada pela concentração, temperatura e tipo de microrganismo (BLOCK, 1991; SAGRIPANTI e BONIFACINO, 1996).

O peróxido de hidrogênio é considerado forte oxidante, devido à sua capacidade de produzir radicais livres que atacam componentes celulares essenciais, incluindo proteínas, lípidios e DNA (KITIS, 2004). Além de agente oxidante, o peróxido de hidrogênio pode também ser empregado como agente redutor (MATTOS et al., 2003).

Por ser bastante versátil, o peróxido de hidrogênio é utilizado para as mais variadas finalidades. Entre as aplicações envolvidas com o uso do peróxido de hidrogênio, tem-se controle de odores, destruição de cloro residual e componentes reduzidos, tais como tiosulfato, sulfetos e sulfitos; redução da demanda química e bioquímica de oxigênio; oxidação de componentes inorgânicos - cianetos, nitritos, hidrazinas, etc.; oxidação de componentes orgânicos- hidrólise de formaldeído, carboidratos, componentes nitrogenados etc., destruição de fenóis, pesticidas,

solventes, plastificantes, entre outros; controle de bio-processos - desinfecção, inibição de crescimento de bactérias etc (MATTOS et al., 2003)

Dentre as desvantagens em relação ao uso desse sanificante podem-se destacar: apresenta poder corrosivo sobre o cobre, zinco e bronze, necessita de longo tempo de contato para baixas temperaturas, demanda precauções no manuseio de dosagem e controle do oxigênio ativo na utilização. Em contrapartida, tem baixa toxicidade residual, e não requer enxágüe (RESENDE, 2005).

Como já foi descrito na revisão, a contaminação por *C. estertheticum* e *C. gasigenes* ocasiona estufamento da embalagem da carne embalada a vácuo refrigerada causando prejuízos econômicos e impacto negativo para o país nas exportações do produto. Sendo assim, uma das formas para controlar esta contaminação seria avaliar a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras ambientais e de carnes embaladas a vácuo, resfriadas, provenientes diretamente de empresas produtoras e exportadoras no Brasil e em carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo comerciais. Além disso, estudos referentes a detecção e isolamentos destes microrganismos são de grande importância uma vez que são escassos trabalhos científicos nesta área devido ao fato destes microrganismos serem anaeróbios estritos o que dificulta a execução de experimentos. Outra forma de controle muito importante é a avaliação do efeito esporicida de diferentes sanitizantes sobre esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, o que teria grande relevância em programas de higienização da indústria de carnes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em cinco etapas. Na primeira, foram realizados testes de avaliação de diferentes métodos de extração de DNA utilizados na detecção de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* inoculados em meio de enriquecimento (caldo PYGS) e em carne bovina embalada a vácuo para verificar a sensibilidade dos métodos.

Na segunda, fez-se detecção, pela técnica da PCR direta (sem enriquecimento) de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de ambientes, superfícies, equipamentos e carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo provenientes de duas empresas produtoras e exportadoras de carne bovina embalada a vácuo, durante um ano, totalizando 10 coletas, sendo cinco em cada empresa. Nestas mesmas amostras testou-se duas metodologias que utilizavam um longo período de enriquecimento (aproximadamente 2 meses) e posterior confirmação por PCR com objetivos de isolar estes microrganismos.

Na terceira etapa, foi feito rastreamento, pela técnica PCR-RFLP, nos isolados de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* obtidos na segunda etapa para verificar a contaminação cruzada no processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo.

Na quarta etapa, foi realizada a detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de carnes bovinas resfriadas embaladas a vácuo provenientes de três empresas adquiridas no comércio.

Na quinta etapa, foram realizados estudos referentes à produção de esporos *C. estertheticum* e *C. gasigenes* e testes esporicidas em relação a diferentes sanitizantes utilizados na indústria de carnes.

Todas as etapas de cultivo, inoculação e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foram realizadas por meio do sistema de anaerobiose Glove bagTM modelo X-37-27 (**Figura 5**) ou da câmara anaeróbia Shell labTM modelo Bactron II Chamber (**Figura 6**), devido à alta sensibilidade destes microrganismos ao oxigênio. As lavagens dos sistemas foram realizadas com gás nitrogênio pureza

99,99% (White Martins, São Paulo, BR) e a atmosfera final era composta por uma mistura gasosa de 5% Hidrogênio +5% Dióxido de Carbono + 90% Nitrogênio (White Martins). Para verificar o sistema eram utilizados indicadores de anaerobiose (Gaspak Anaerobic Indicator, BBL, USA). A etapa de incubação era realizada em jarras de anaerobiose com geradores de anaerobiose. Todos os meios de culturas, diluentes e reagentes eram pré-reduzidos em anaerobiose durante 48 horas antes da realização de etapas de repicagem, cultivo, inoculação, isolamento, provas de identificação e esporulação.



Figura 5. Sistema de anaerobiose Glove bag™ modelo X-37-27



Figura 6. Câmara de anaerobiose Shell lab™ modelo Bactron II Chamber

4.1 Avaliação de diferentes métodos de extração de DNA para detecção de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de carne

Abaixo (**Figura 7**) está representado o fluxograma dos experimentos realizados para a avaliação de diferentes métodos de extração de DNA, para detecção de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, em amostras de carne. Nesta etapa, foram realizados seis experimentos, separadamente, com triplicata para cada microrganismo.

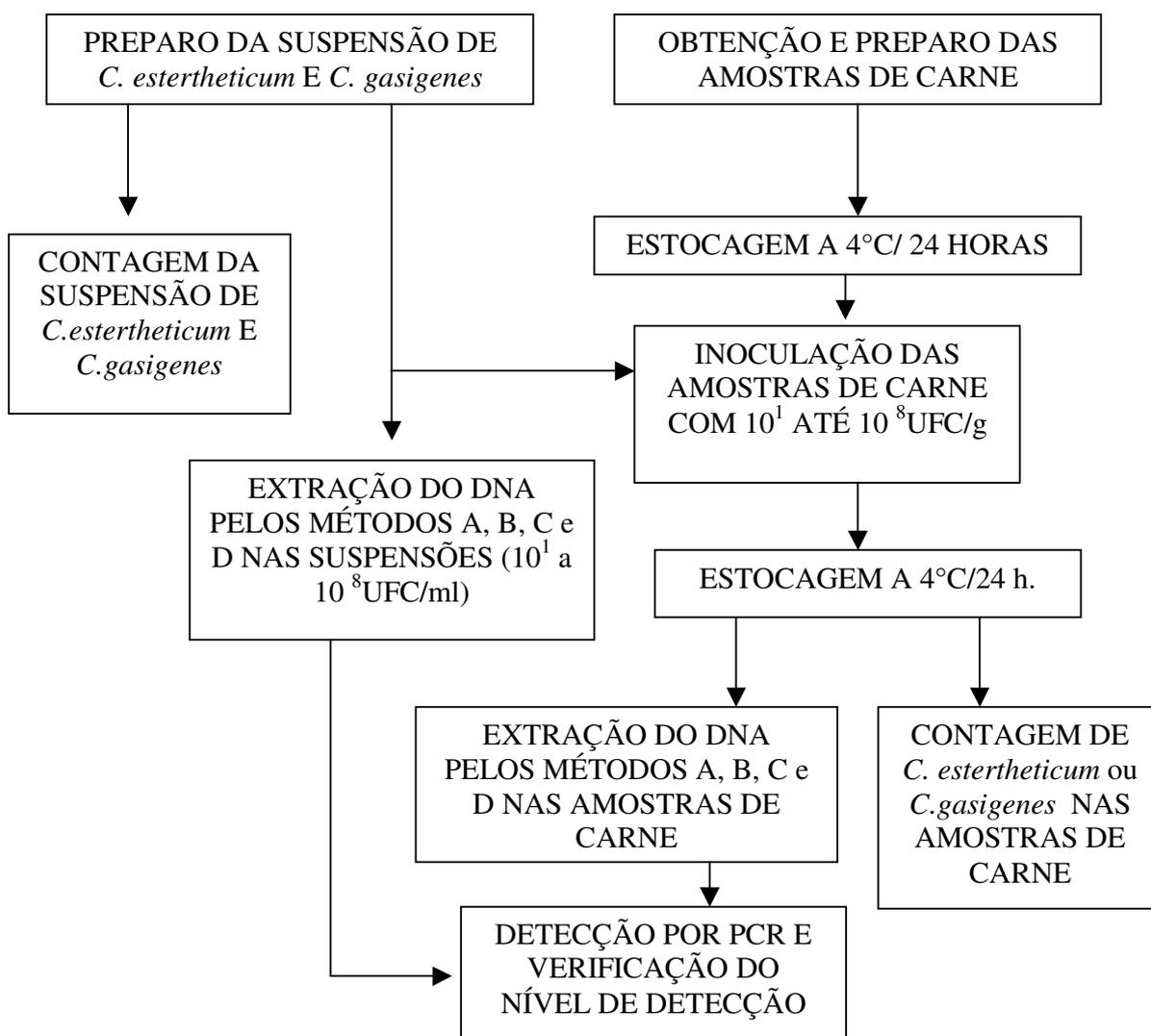


Figura 7. Fluxograma do experimento utilizado para a avaliação de diferentes métodos de extração de DNA, para detecção de *C. gasigenes* e *C. estertheticum* em carne.

4.1.1 Microrganismos

A cepa padrão de *Clostridium estertheticum* DSM 8809^T (T= cepa padrão) foi obtida da *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig*, Alemanha. Esta cepa foi reativada em meio PYGS [peptona (Difco, Detroit Michigan, USA) levedura (Difco), glicose (Difco) e amido (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)] (Lund et al., 1990) com carne cozida e em meio Reinforced Clostridial – RCM (Difco) suplementado com 1% glicose (Difco) e 0,2% bicarbonato de sódio (Ecibra, São Paulo, Brasil), com carne cozida, ambos pré-reduzidos. A cepa foi incubada a 4°C, por 14-21 dias, em anaerobiose.

A cepa padrão de *Clostridium gasigenes* DSM 12272^T também foi obtida da *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig*, Alemanha. Esta cepa foi reativada nos caldos CMM (*Chopped meat médium*) e PYGS com carne cozida, ambos pré-reduzidos. A cepa foi incubada a 15°C, por 7 dias, em anaerobiose (CLAROS et al., 1995).

4.1.2 Preparo da suspensão de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Para o preparo da suspensão da cultura de *C. estertheticum*, uma alçada do microrganismo foi transferida para o caldo PYGS pré-reduzido e incubado a 10°C, por 72 horas, em anaerobiose (LUND et al. 1990). A cultura foi diluída até 10⁻⁸ e as diluições foram inoculadas em PYGS e incubadas, anaerobiamente, a 10°C, por 72 horas. Após, foram realizadas as contagens das colônias para posterior padronização do inóculo (BRODA et al., 2000).

O preparo e a padronização da suspensão da cultura de *C. gasigenes* foi realizado da mesma maneira que o *C. estertheticum*, porém as condições de cultivo foram de 15°C durante 48 horas (BRODA et al., 2000).

4.1.3 Obtenção e preparo das amostras de carne

As peças de carne (miolo de alcatra) resfriadas foram adquiridas dos matadouros-frigoríficos para a realização deste experimento. As peças foram imersas em água fervente durante dois minutos e, em seguida, a camada externa foi removida, assepticamente, (PASSOS, 2000) com o objetivo de diminuir a contaminação microbiana superficial. Com a parte interna, foram preparados cubos de carne bovina de, aproximadamente, 25 g nas seguintes medidas: 2 cm de espessura, 3 cm de comprimento e 4 cm de largura. As amostras foram embaladas a vácuo em filme coextrusado de acetato de vinila/ cloreto de polivinilideno/acetato de vinila (EVA/PVDC/EVA), individualmente. No centro das embalagens, por meio de uma bisnaga de vedante de silicone comercial de base acética, foram confeccionados septos, de acordo com Saiki, 2002. As amostras ficaram estocadas a 4°C durante 24 horas para, em seguida, serem inoculadas com *C. estertheticum* ou *C. gasigenes*.

4.1.4 Inoculação

A inoculação de 1 mL da suspensão padronizada com 10^1 até 10^8 UFC/mL em diluições seriadas de 1 a 8 de *C. estertheticum* ou *C. gasigenes* foi realizada através do septo de silicone, sem perda de vácuo, em cada amostra. As amostras foram incubadas a 4°C por 24 horas.

A extração do DNA e a contagem microbiana de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, nas diferentes diluições, foram realizadas no mesmo dia da inoculação e, após 24 horas, foram realizadas contagens nas amostras de carne inoculadas. Posteriormente, houve a realização da técnica PCR.

4.1.5 Contagem de *Clostridium gasigenes* e *Clostridium estertheticum*

As contagens de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* nas amostras de carne foram realizadas, após 24h a 4°C. Para as amostras de carne, foram feitas

diluições seriadas em solução salina (0,85% de NaCl) a partir de 1 mL do líquido liberado das amostras de carne. O volume de 0,1 ml das diluições foi inoculado em ágar PYGS pré-reduzido. As placas foram incubadas em anaerobiose, a 10°C durante 72h para *C. estertheticum* e a 15°C durante 48h para *C. gasigenes* (BRODA et al., 1996b e 1998). Após, foram realizadas as contagens das colônias, sendo que os resultados foram expressos em UFC/mL.

4.1.6 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por quatro métodos distintos com objetivo de avaliar métodos mais econômicos e rápidos em relação ou “kit” comercial. Os métodos estão descritos abaixo:

Método A: A extração do DNA foi realizada a partir de 200 µL do líquido liberado da amostra de carne e do caldo PYGS, com a utilização de “High Pure DNA Kit” (Roche). O procedimento foi o mesmo recomendado pelo fabricante. As células foram suspensas em 200 µL de lisozima (Sigma, St. Louis, USA) a 10 mg/mL e incubadas a 37°C por 60 minutos. A partir deste passo, recomendado pelo protocolo do *kit*, houve a incorporação de proteinase K (Invitrogen, Carlsba, CA) a 10 mg/mL na lise e a subsequente precipitação com isopropanol e lavagem com etanol. Após, o DNA foi estocado em tampão TE (LCG, São Paulo, Brasil) a -20°C, para posterior amplificação do DNA (BRODA et al., 2003).

Método B: 250 µL do líquido liberado da amostra e do caldo PYGS foram centrifugados a 13.000xg durante 10 minutos. Após retirada do sobrenadante, foram adicionados 95 µL de tampão PCR 1 X com 100 mM TrisHCl e 500 mM de KCl (LCG, BR) e de 4 µL de lisozima (Sigma) a 20 mg/mL deixando-se por 15 minutos. No próximo momento, foi adicionado 1 µL de proteinase K (Invitrogen) a 50 mg/mL e incubado a 55-60°C por 60 minutos e a 95 °C por 8 minutos. Foi realizada, ainda, a centrifugação de 13.000xg durante 5 segundos, guardando-se o DNA obtido em tampão TE a -20°C (FURRER et al. 1991).

Método C: 250 µL do líquido liberado da amostra e do caldo PYGS foram centrifugados (5.000 x g, por 15 min), lavados, uma vez, com água de Milli-Q (Millipore) e re-suspendidas em 1,5 mL da solução TE com 10 mM de Tris (Sigma) e 1 mM EDTA (Sigma). Desta suspensão bacteriana, foram tomados 100 µL e adicionados, a igual volume, de tampão de lise contendo 20 µL de proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen), 20 µL dodecilsulfato de sódio a 10% (sigma) e 40 µL de tampão (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, 250 mM de NaCl, LCG), mantidos a 56°C por 90min e após centrifugação o DNA (precipitado) foi armazenado em em tampão TE (AUSUBEL et al., 1999).

Método D: 250 µL do líquido liberado da amostra e do caldo PYGS foram centrifugados a 13.000xg durante 10 minutos. Após o desprezo do sobrenadante, foram adicionados 100 µL de tampão TE (LCG) com 10mM de Tris e 1mM EDTA e submetidos a 100°C durante 10 minutos. Depois, foi realizada a centrifugação (13000xg/ 3 minutos) e o DNA foi armazenado em tampão TE a -20°C (KABUKI et. al., 2005).

4.1.7 Técnica de PCR

Para a detecção do *C. estertheticum* foram utilizados os primers 16 SEF e 16 SER. A seqüência dos primers é: 16 SEF (forward) 5'- TCG GAA TTT CAC TTT GAG-3'(Invitrogen) e 16SER (reverse) 5'- AAG GAC TTC ACT CAT CTC TG - 3' (Invitrogen). O anelamento destes primers tem posições 207-223 e 996-997, respectivamente, na seqüência 16S rDNA do *C. estertheticum* (GenBank acesso S46734). O tamanho exato do produto da PCR obtido é de 790 bp (BRODA et al., 2003).

Para a detecção do *C. gasigenes* foram usados os primers 16 SDBF e 16 SDBR. A seqüência dos primers é: 16 SDBF (forward) 5'- GAG AGG AGT TCT TCG GAA GGA-3'(Invitrogen) e 16 SDBR (reverse) 5'- AAG CSA CTT CCC CAA TTA C - 3'(Invitrogen). O anelamento destes primers tem posições 61-81 e 995-

977, respectivamente, na seqüência 16S rDNA do *C. gasigenes* (GenBank acessos AF092548 e AF143692). O tamanho exato do produto do PCR obtido com estes primers é de 935 bp (BRODA et al., 2003).

A reação de amplificação foi preparada em 25 µL do volume total, contendo: 10 µL tampão de PCR 10x (LCG) contendo 100 mM de TrisHCl e 500 mM de KCl pH 8,5; 1µL dNTP a 10 mM (Invitrogen); 0,25 µL Taq-polimerase (1U/ul, LCG); 0,5 µL de cada um dos primers a 100 mM (Invitrogen); 2,5 µL do DNA extraído e água esterilizada.

A amplificação do DNA com os primers 16 SEF e 16 SER, 16 SDBF e 16 SDBR foi realizada em termociclador, utilizando-se um ciclo inicial a 93°C/3min, 30 ciclos de desnaturação a 92°C/1min, anelamento a 55 °C/1min, extensão a 72°C/2min e ciclo final a 72°C/3min (BRODA et al., 2003).

Cada produto de PCR foi separado por eletroforese horizontal, em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen), corado com SYBER Safe™ (Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA), visualizado em transluminador por luz ultravioleta e fotodocumentado. Marcadores de peso molecular foram adicionados a cada gel (BRODA et al., 2003).

4.2 Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* no ambiente de empresa de abate bovino e de processamento de carne resfriada embalada a vácuo

Pode-se observar, na **Figura 8**, um esquema referente ao experimento de detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em ambientes na planta de abate de bovinos e carne bovina embalada a vácuo.

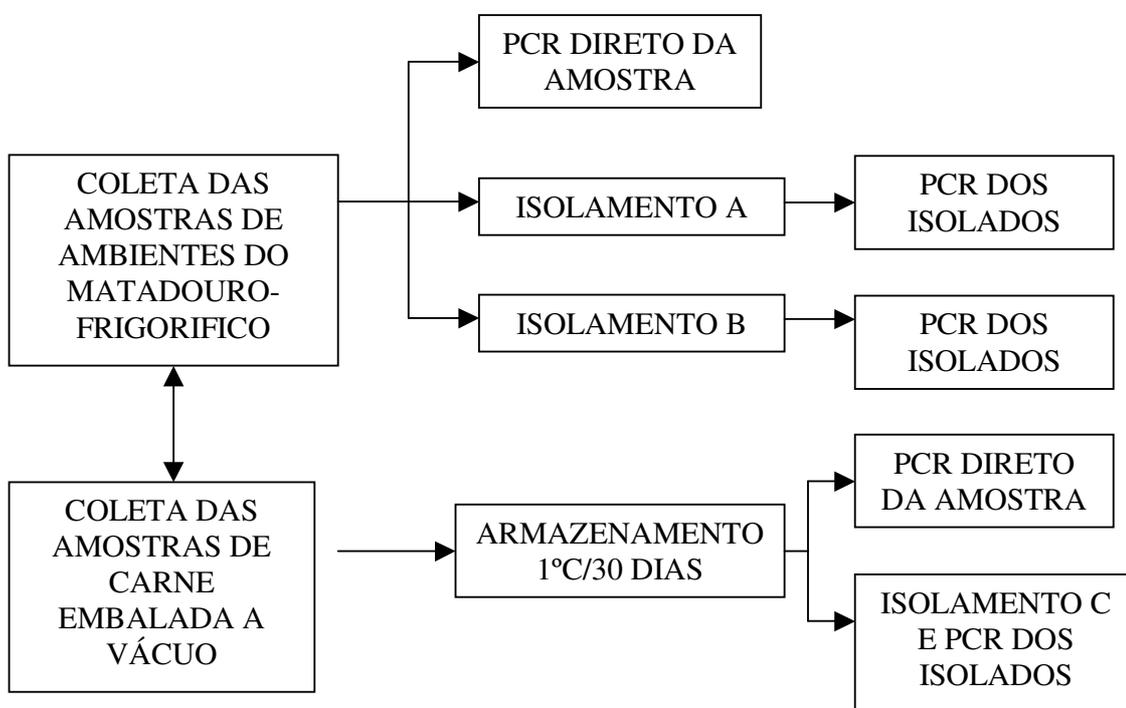


Figura 8. Esquema para detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* na planta de abate de bovinos e em carne bovina embalada a vácuo

4.2.1 Empresas

As amostras foram coletadas em 2 matadouros-frigoríficos exportadores de carne bovina embalada a vácuo.

A empresa “A” era um matadouro-frigorífico localizado no Estado de São Paulo, com abate de, aproximadamente, 800 cabeças por dia. Setenta por cento (70%) da produção destinava-se à exportação para países do Oriente médio e Rússia, entre outros. Os produtos de exportação eram cortes do traseiro resfriados embalados a vácuo e cortes do músculo dianteiro congelados.

A empresa “B” era um matadouro-frigorífico localizado no Estado de Goiás, com abate de, aproximadamente, 1100 cabeças por dia. Oitenta por cento (80%) da produção era destinada à exportação para países da União Européia, Oriente médio e Rússia, entre outros. Os produtos de exportação eram: cortes do traseiro resfriados embalados a vácuo (principalmente para países da União Européia) e cortes do dianteiro congelados (para países do Oriente Médio).

4.2.2 Coleta das amostras

As coletas das amostras foram realizadas em cinco épocas diferentes, durante o período de um ano, totalizando 10 coletas, sendo cinco em cada matadouro-frigorífico.

Na empresa “A” foram coletadas 52 amostras na planta de abate e 16 amostras de carne embalada a vácuo totalizando 68 amostras, em cada coleta. Nesta empresa o total global foi de 340 amostras, sendo 260 amostras de ambiente da planta de abate e 80 de carne embalada a vácuo.

Já na empresa “B”, foram coletadas 60 amostras na planta de abate e 16 amostras de carne embalada a vácuo totalizando 76 amostras, em cada coleta. Nesta empresa o total global foi de 380 amostras sendo 300 da planta de abate e 80 de carne embalada a vácuo. Assim, foram coletadas 720 amostras nas empresas A e B.

4.2.2.1 Piso e paredes

Amostras de piso foram coletadas em diferentes locais: no curral, no box de atordoamento, na sala de abate, na sala de desossa e em diferentes câmaras frias. Amostras de parede foram coletas na sala de abate. Para amostras de piso e parede utilizou-se a técnica de coleta por esponja (Nasco, Wisconsin, USA) pré-umedecida em 20 mL de água salina (0,85%). Com o auxílio de luvas estéreis, a esponja foi esfregada numa superfície de, aproximadamente, 900 cm².

4.2.2.2 Fezes e intestino

Amostra de fezes e intestinos (em torno de 500 gramas) foram coletas nos currais de espera e na sala de triparia, respectivamente, com o auxílio de luvas e sacos de coleta (Nasco, Wisconsin, USA) estéreis.

4.2.2.3 Ralo

As amostras de ralo foram coletadas no box de atordoamento, na sala de abate, na sala de desossa e em diferentes câmaras frias. Utilizou-se a técnica de coleta por esponja pré-umedecida em 20 mL de água salina (0,85%). Com o auxílio de luvas estéreis, foi realizado esfregação na superfície e no interior dos ralos.

4.2.2.4 Canaleta de sangria

A técnica de esponjas também foi utilizada na canaleta de sangria, por esfregação nas laterais da canaleta.

4.2.2.5 Pele e pata do animal

Após a sangria, foram coletadas amostras da superfície da pele próxima à área do pescoço e das patas dianteiras do animal, através da técnica de esponja.

4.2.2.6 Equipamentos

As amostras de equipamentos (rolete de retirada do couro, embaladora a vácuo, serra elétrica) foram coletadas através do método de esponja, por esfregaço em toda a superfície dos equipamentos, inclusive na parte interna.

4.2.2.7 Superfície de carcaças

As coletas nas amostras de superfícies de carcaças (após a retirada do couro) e meia carcaças (nas câmaras frias) foram realizadas, por meio da técnica de esfregaço, com esponjas (Nasco, Wisconsin, USA) pré-umedecidas em 20mL de água salina (0,85%) nos pontos representados na **Figura 9**, correspondendo à área de 100 cm² em cada ponto .

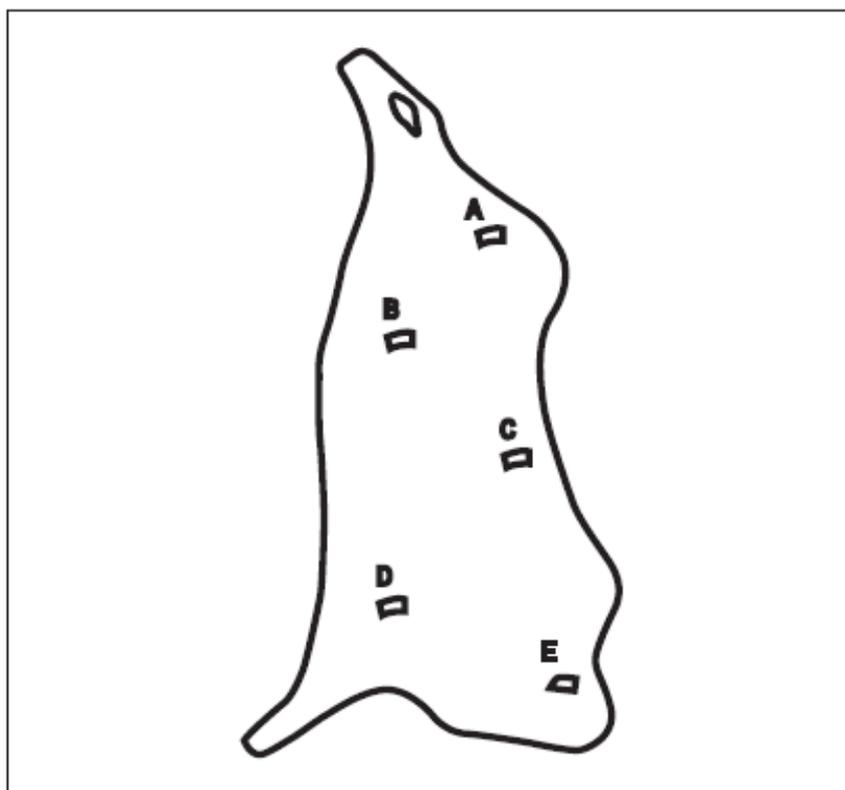


Figura 9. Pontos de coleta de amostras de superfície de meia carcaça de bovino.

Fonte: ABNT, 1988.

4.2.2.8 Mesas e esteiras

Amostras foram coletadas nas superfícies de mesas e de esteiras pertencentes à sala de abate (mesa de vísceras) e à sala de desossa. Utilizou-se a técnica de esponjas, pré-umedecida em 20 mL de água salina (0,85%), sobre uma superfície de, aproximadamente, 1600cm².

4.2.2.9 Evaporadores

Amostras de evaporadores foram coletadas na sala de abate, na sala de desossa e em diferentes câmaras frias, por meio da técnica de esponja, pré-umedecida em 20 mL de água salina (0,85%), nas partes frontal e posterior, inclusive entre as canaletas. No frigorífico “B”, a coleta nos evaporadores foram realizadas através do telhado, na saída de ar do evaporador.

4.2.2.10 Carnes embaladas a vácuo

Na sala de embalagem e pesagem foram coletadas, após o resfriamento, amostras dos seguintes cortes bovinos embalados a vácuo: contrafilé (*longissimus dorsi*), miolo de alcatra (*gluteus medius*), ponta de contrafilé (*longissimus dorsi*) e filé-mignon (*psoas major*).

4.2.3 Transporte e armazenamento das amostras

As amostras, após as coletas, foram armazenadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas até o Laboratório de Higiene DTA/UNICAMP, para realização das análises de *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, pela técnica de PCR e de isolamento dos microrganismos.

As amostras de carne foram armazenadas sob refrigeração (1°C) durante 30 dias, para posterior análise.

4.2.4 Detecção de *C. gasigenes* e *C. estertheticum* pela técnica da PCR direto das amostras ambientais e de carne embalada a vácuo

4.2.4.1 Extração do DNA

Após homogeneização das esponjas em “Stomacher” por 1 minuto, foram retirados 200 µl para a extração do DNA, utilizando-se “High Pure DNA Kit” (Roche). Também foram submetidos à extração de DNA pelo “kit”, conforme descrito no item 4.1.6., 200 µl do extrato líquido exsudado das amostras de carne. Vinte e cinco gramas (25g) de amostra de fezes e intestinos foram homogeneizados com 225 mL de solução salina (0,85%), em “Stomacher”, durante 1 minuto e, após, 200 µl foram submetidos à extração de DNA com o “kit”.

4.2.4.2 Técnica da PCR

Para a detecção do *C. estertheticum* foram utilizados os primers 16 SEF e 16 SER. Na detecção do *C. gasigenes* foram usados os primers 16 SDBF e 16 SDBR, segundo a metodologia descrita em 4.1.7.

4.2.5 Isolamento do *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Para as amostras de superfícies coletadas com esponja (piso, ralo, canaletas, pele e pata do animal, equipamentos, carcaças, mesas, esteiras e evaporadores) de plantas de processamento de carne bovina embalada a vácuo foram utilizadas duas metodologias de isolamento (**Figuras 10 e 11**).

Para amostras de corte bovino embalado a vácuo foi utilizada metodologia em conformidade ao fluxograma apresentado na **Figura 12**.

4.2.5.1 Técnica de isolamento A (isolamento A)

Inicialmente, realizou-se a homogeneização das amostras de superfícies e ambientes (esponjas pré-umedecidas em 20 mL de solução salina), em

“Stomacher” (Lab-Blender 400), durante 1 minuto. Nas amostras de fezes e intestino grosso, foi feita a homogeneização de 25 g em 225 mL de solução salina em “Stomacher” durante 1 minuto.

Após a homogeneização, foi aplicado em 5 mL da amostra, um choque térmico a 80°C durante 10 minutos, com objetivo de eliminar as células vegetativas e promover a esporulação. Após, foi inoculado 2 mL da amostra em caldo PYGS com carne cozida, ambos pré-reduzido, e incubado em anaerobiose a 4°C durante 21 dias. Após essa incubação, foi realizado estrias em placas de ágar CBA [*Columbia Blood Ágar base*, (Difco) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado] pré-reduzido em anaerobiose durante 48 horas, a seguir, as placas foram incubadas a 10°C por 21 dias. Após a incubação, foram selecionadas cinco colônias isoladas nas placas. A verificação da pureza da cultura foi realizada em CBA (Difco) incubada a 10°C por 10 dias e então, as colônias foram inoculadas em caldo PYGS com carne cozida pré-reduzido e foram incubadas a 10°C por 7 dias, para posterior caracterização.

As colônias foram caracterizadas como *Clostridium sp.* através de coloração de Gram, teste de catalase e crescimento em aerobiose. As colônias caracterizadas como *Clostridium sp.* foram submetidas a técnica PCR para identificação de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

O método de extração de DNA para realização da técnica da PCR utilizado foi o descrito por Furrer et al. (1991) e a metodologia da PCR, de acordo com o item 4.2.7.

4.2.5.2 Técnica de isolamento B (isolamento B)

As amostras (esponjas ou 25g - no caso de fezes e intestino) foram inoculadas em 225 mL de caldo PYGS com carne cozida pré-reduzidos. Nesta metodologia não foi realizado o choque térmico, sendo que a amostra foi levada

diretamente à incubação a 4°C por 21 dias. Após este passo, a seqüência se deu de forma igual à técnica de isolamento “A”.

4.2.5.3 Técnica de isolamento C (isolamento C)

Após armazenamento a 1°C por 30 dias, as amostras de carne bovina embalada a vácuo foram submetidas à técnica de isolamento C (**Figura 12**). Inicialmente, foi realizada a desinfecção das amostras com álcool 70%. Posteriormente, foram retirados 2 mL do líquido exsudado com uma seringa estéril e auxílio de um septo de silicone, com o objetivo de evitar a entrada de oxigênio na amostra durante a retirada do líquido. Em seguida, foram retirados 2 mL da amostra e inoculados em tubos com 18 mL de caldo PYGS com carne cozida, sendo incubados a 4°C durante 21 dias. O procedimento de isolamento e identificação foi realizado conforme descrito no item 4.2.5.1 (isolamento “A”).

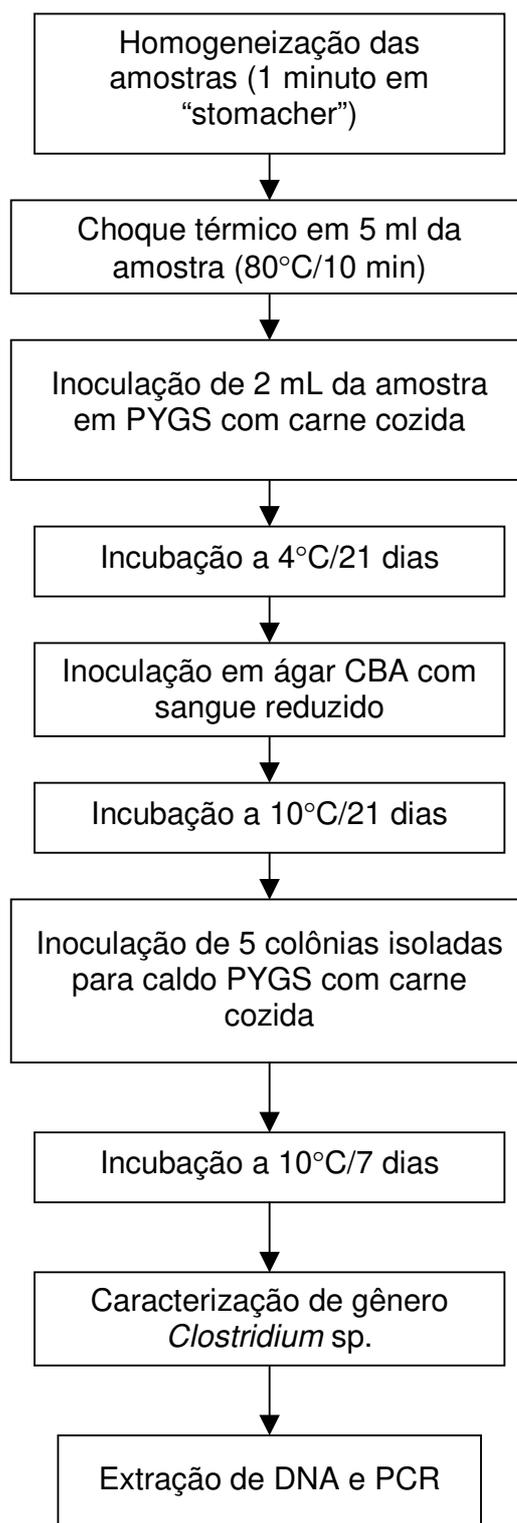


Figura 10. Fluxograma da técnica de isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* com aplicação de choque térmico – isolamento A, amostras ambientais

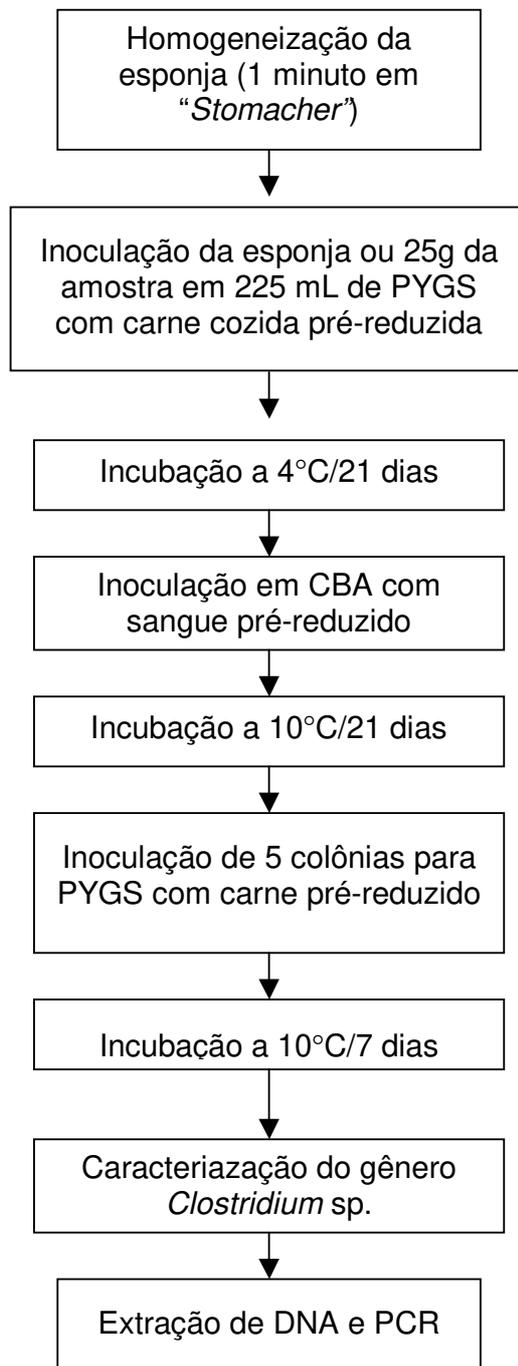


Figura 11. Fluxograma da técnica de isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* – isolamento B, amostras ambientais

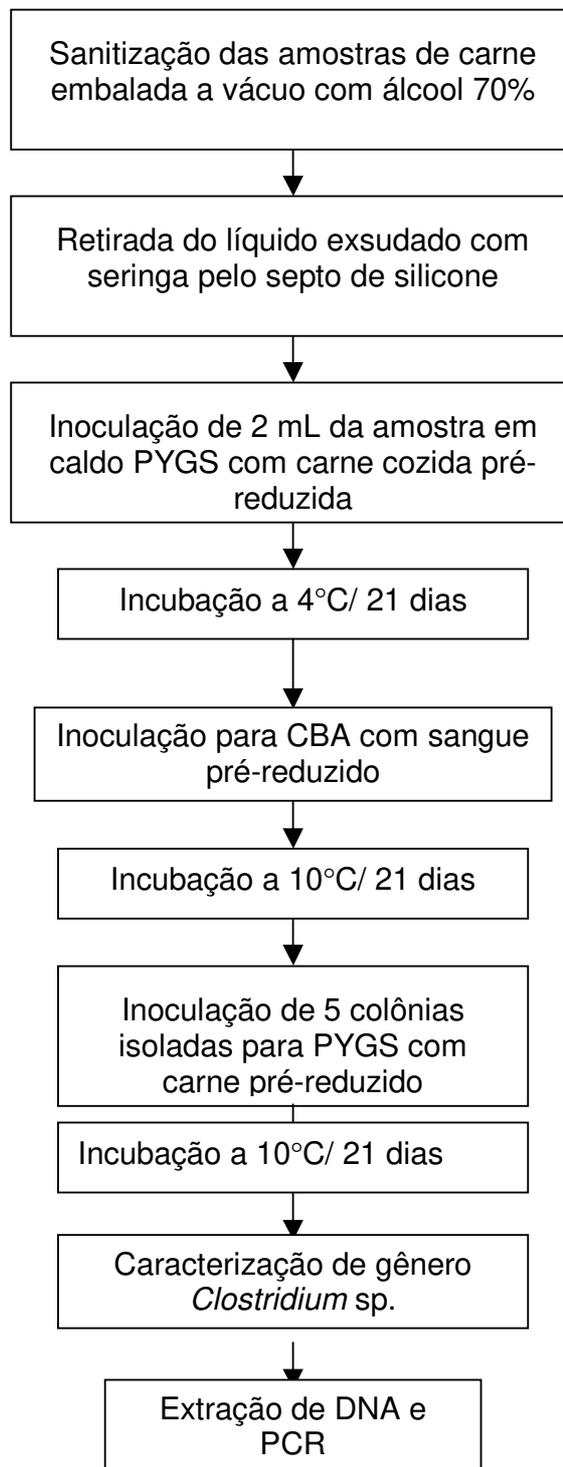


Figura 12. Fluxograma da técnica de isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* de carne bovina embalada a vácuo – isolamento C

4.3 Rastreamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em cepas isoladas da planta de abate de bovinos, utilizando-se a técnica PCR-RFLP

4.3.1 Cepas padrão e isolados

As cepas padrão de *Clostridium estertheticum* DSM 8809^T (T= cepa padrão) e *Clostridium gasigenes* DSM 12272^T foram obtidas da *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig*. Também foram utilizadas todas as culturas isoladas das superfícies dos equipamentos dos dois frigoríficos anteriormente mencionados e das amostras de carne bovina embalada a vácuo.

4.3.2 Extração do DNA

As culturas foram inoculadas em caldo PYGS e incubadas a 10°C por 7 dias. Para a extração do DNA, 250 µL da cultura foram submetidos à metodologia descrita anteriormente (FURRER et al. 1991).

4.3.3 Técnica da PCR- RFLP

A técnica da PCR-RFLP foi realizada para a amplificação do gene 16S rDNA e, foram utilizados os seguintes primers universais: pA (forward) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (Prodimol) e pH (reverse) 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Prodimol), segundo a metodologia descrita por Hutson et al., 2003.

A mistura da PCR, foi preparada de acordo com protocolo recomendado por *Boehringer Mannheim GmbH* (Broda et al., 2000b), contendo 10 µl tampão PCR 10X (LCG) com 100 mM TrisHCl e 500 mM KCl; 2 µL de dNTPs a 10 Mmol (Invitrogen); 6 µL de MgCl₂ a 25 mM (Invitrogen); 1µl de cada primer a 100 mM (Promega, Madison, USA), 0,5 µl unidades de *Taq* polimerase a 1 U/µl (LCG) e

10 µl de DNA (100ng) em um volume total de 100 µl. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador e com a utilização de um ciclo inicial a 42°C/3min, 30 ciclos de desnaturação a 92 °C durante 1 min, anelamento a 55 °C durante 1min, extensão a 72°C durante 2 min e ciclo final a 72°C/3min (BRODA et al., 2000). Os tubos de PCR contendo os fragmentos 16S rDNA amplificados foram armazenados a – 20°C até análises posteriores.

Os produtos amplificados da PCR do gene 16S rDNA amplificado dos isoladas de amostras de carne, ambientes e equipamentos dos matadouros-frigoríficos foram digeridos com 4 diferentes enzimas de restrição: *AluI*, *HaeIII*, *TaqI* e *CfoI* (Promega). A digestão de restrição continha 10 µl do produto do PCR, 2 µl do tampão de cada enzima e 10 U da enzima - com um volume total de 20 µl. A digestão realizada com *AluI*, *HaeIII* e *CfoI* foi incubada durante 2 horas a 37°C e a digestão com *TaqI* foi incubada durante 2 horas a 65°C. Os produtos de digestão foram separados por gel de agarose (Invitrogen) a 2,0%, a 90V, durante 2 horas. Utilizou-se marcador molecular 1Kb DNA ladder (LCG), sendo corados com SYBER Safe™, visualizados por luz ultravioleta e fotodocumentados.

4.4 Ocorrência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de carnes resfriadas embaladas a vácuo obtidas do comércio

A ocorrência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em cortes de carnes embaladas a vácuo e resfriadas foi realizada por meio da técnica de PCR e, também, do método convencional de cultivo e isolamento em meio de cultura.

4.4.1 Amostras

Um total de 60 amostras de contrafilé (*longissimus dorsi*), alcatra (*gluteus medius*) e ponta de contrafilé (*longissimus dorsi*) de quatro diferentes marcas foi analisado, com data de produção superior a 30 dias, adquiridas no comércio varejista da região de Campinas-SP.

4.4.2 Amostragem

A superfície da embalagem foi sanitizada com álcool 70%. Então, com o auxílio de uma seringa estéril, foi retirado uma alíquota do líquido exsudado, para posterior realização da técnica PCR e de isolamento.

4.4.3 Detecção de *C. gasigenes* e *C. estertheticum* pela técnica da PCR

A detecção de *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, através da técnica PCR, foi realizada a partir de 200 µl do líquido exsudado e de acordo com a metodologia descrita em 4.2.4.

4.4.4 Isolamento do *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

O isolamento foi realizado a partir de 2 mL do líquido exsudado das amostras de carne e através da metodologia de isolamento descrita no item 4.2.5.3 (**Figura 12**), a mesma realizada nas amostras de carne embalada a vácuo coletadas nos matadouros-frigoríficos.

4.4.5 Tipagem genética dos isolados

Foi realizado a tipagem genética dos isoladas pela técnica PCR-RFLP segundo metodologia descrita nos itens 4.4.2 e 4.4.3.

4.5 Análise da composição de gases em amostras estufadas

4.5.1 Amostras

Foram utilizadas três amostras estufadas para a determinação da composição dos gases. A primeira amostra foi contrafilé (*longissimus dorsi*) com a embalagem estufada, adquirido no comércio de Campinas – SP, onde foi detectado *C. estertheticum*. Nas segunda e terceira amostras foram utilizadas carnes

embaladas a vácuo, intencionalmente contaminadas com *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, respectivamente.

4.5.2 Análise quantitativa de gases por cromatografia gasosa

Foram retiradas com seringa alíquotas de 300 µL de gás do espaço livre (headspace), para quantificação do gás de nitrogênio, gás carbônico e oxigênio em cromatógrafo a gás, marca “Shimadzu”, modelo 14A. Os resultados de cromatografia foram analisados por um integrador, com base em curva padrão feita com gás de calibração. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.5.3 Análise qualitativa por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas e headspace

Utilizou-se um cromatógrafo gasoso, com as seguintes características: marca “Shimadzu”, modelo QP 5000, com injetor split/splitless, coluna capilar– “HP5-MS” – 30m (comprimento) x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25µm (espessurado filme) nominal e detector FID (detector de ionização por chama).

O injetor operou no modo *splitless*, com temperatura do bloco a 200°C. O forno estava programado para uma temperatura inicial de 40°C, mantendo-se assim durante 02 minutos. Após, a 10°C/min até 40°C e a 15°C/min até 250°C, mantendo-se assim durante 21 minutos. A temperatura do detector era de 180°C e o gás de arraste N₂ era mantido ao fluxo constante de 1mL/min.

4.6 Atividade de diferentes sanitizantes sobre os esporos de

C. estertheticum* e *C. gasigenes

4.6.1 Preparo da suspensão de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Para o preparo da suspensão de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* uma alçada da cultura foi transferida para caldo PYGS (peptona, extrato de levedura, glicose amido) (LUND et al. 1990) pré-reduzido e incubada em anaerobiose a 10°C por 96 horas (BRODA et al. 2006). Após 96 horas, 1 mL foi inoculados em três diferentes meios:

(a) meio contendo duas fases onde a fase sólida constituíu-se 30g carne cozida, 0,5g de glicose e 4,5g de ágar em 350 mL de água e uma fase líquida constituída de 50 mL água destilada estéril, pré-reduzida (BELL et al., 2001);

(b) meio contendo 350 mL de ágar PYGS com 30g carne cozida e uma fase líquida constituída de 50 mL água destilada estéril, pré-reduzida;

(c) meio contendo 350 mL de ágar RCM com 30g carne cozida e uma fase líquida constituída de 50 mL água destilada estéril, pre-reduzida.

Após as inoculações, os meios foram incubados em anaerobiose a 10°C, para o *C. estertheticum*, e a 15°C para o *C. gasigenes*. A produção de esporos foi verificada mensalmente através de microscopia de contraste de fase segundo Bell et al. (2001). Após, foi realizado lavagem em centrífuga segundo Broda et al. (2007) e a suspensão de esporos ficou armazenada a -18°C.

4.6.2 Contagem de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Para a contagem dos esporos de *C. gasigenes* foram testadas, em triplicata, as seguintes metodologias:

(a) diluição em solução salina e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 15°C por três semanas (BRODA et al, 1998).

(b) diluição em solução salina e posterior choque térmico a 60°C por 30 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 15°C por três semanas (BRODA et al, 2007).

(c) diluição em solução salina e posterior choque térmico a 60°C por 10 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 15°C por três semanas (BRODA et al, 1998).

(d) diluição em solução salina e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em agar PYGS e incubação a 15°C por três semanas.

(e) diluição em solução salina e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em agar PYGS com lisozima e incubação a 15°C por três semanas.

(f) diluição em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0.67M pH 7,00; Merck, Rio de Janeiro, BR) e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 15°C por três semanas.

(g) diluição em tampão fosfato e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em PYGS e incubação a 15°C por três semanas.

(h) diluição em tampão fosfato e posterior choque térmico a 60°C por 30 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 15°C por três semanas.

Para a contagem dos esporos de *C. estertheticum* foram testadas, em triplicata, as seguintes metodologias:

(i) diluição em solução salina e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 10°C por três semanas (BRODA et al, 1998).

(j) diluição em tampão fosfato e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 10°C por três semanas.

(k) diluição tampão fosfato e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em agar PYGS e incubação a 10°C por três semanas.

(l) diluição em tampão fosfato e posterior choque térmico a 60°C por 30 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 10°C por três semanas.

(m) diluição em tampão fosfato e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 4°C por três semanas.

4.6.3 Sanitizantes

Os sanitizantes testados foram Divoson Forte® 100 mg/L e 500 mg/L (a base de ácido peracético JohnsonDiversey); Divoson Hypochlorite® 100 mg/L (a base de hipoclorito de sódio, JohnsonDiversey) e Virox® 200 mg/L (a base de peróxido de hidrogênio, ácido dodecilbenzasulfônico e ácido fosfórico, JohnsonDiversey).

4.6.4 Teste esporicida

Foi utilizado o método da União Européia prEN14347, sendo utilizado 0,2 mL da suspensão de esporos com 0,8 mL do sanitizante. A suspensão ficou em contato com o sanitizante por 5, 15 e 30 minutos e em seguida 0,1 mL foi neutralizada em caldo triptona de soja com 0,5% de tiosulfato de sódio para sanitizantes a base de ácido peracético e hipoclorito de sódio e com 0,5 mg/mL da enzima catalase para sanitizantes base de peróxido de hidrogênio. Após cinco minutos de contato com a solução neutralizante, foram realizados as diluições e plaqueamento em CBA e posterior incubação a 10°C por 3 semanas. As colônias em CBA foram contadas e o efeito esporicida do sanitizante foi avaliado pelo fator de inativação (IF), o qual foi calculado pela redução de \log_{10} UFC da contagem inicial em relação ao inóculo final (WULLT et al.,2003). Este teste foi realizado em triplicata para cada sanitizante testado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de diferentes métodos de extração de DNA para detecção de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de carne

Nas **Figuras 13 a 21**, estão apresentados os perfis da eletroforese dos produtos da PCR do gene 16S rDNA genômico que foram obtidos a partir de diferentes métodos (A, B, C, e D) de extração, após diluições seriadas do caldo PYGS e carne bovina embalada a vácuo inoculados com *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

O método **A**, que utiliza o “kit HighPure DNA”, tem sido o mais usado em trabalhos publicados sobre clostrídios psicrotolerantes, sendo também utilizado para detecção direta de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo (BRODA et al., 2000; BRODA et al., 2003). O método **B** foi utilizado, devido a sua similaridade com o método A, na lise celular com lisozima e proteinase K. O método **C** foi escolhido a partir da sua utilização, por outros autores, em extração de DNA de cepas do gênero *Clostridium* sp. (CHOMKZYNKI, 1993; PENHA et al., 1995), usando-se apenas proteinase K. O método **D**, sem enzimas por sua vez, foi escolhido por ser econômico, fácil e prático.

Pelos resultados pode-se observar a detecção de 10^3 , 10^5 , 10^6 UFC/mL em caldo PYGS inoculado com *C. estertheticum* para as metodologias A, B e C respectivamente (**Figura 13 a 15**). Em caldo PYGS inoculado com *C. gasigenes* foi possível verificar uma sensibilidade de detecção de 10^4 , 10^5 , 10^4 UFC/mL para os métodos A, B e C respectivamente (**Figura 17 a 19**). Através do método D não foi possível detectar a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

a) Perfis dos géis de agarose do produtos da PCR do gene 16 S rDNA de *C. estertheticum* em caldo PYGS

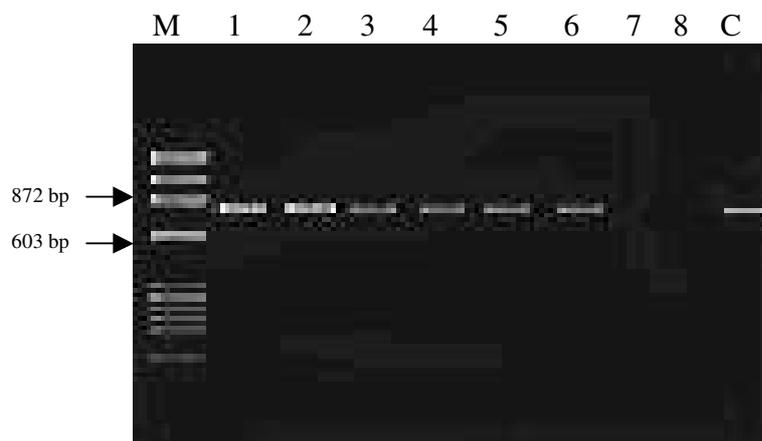


Figura 13. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. estertheticum*, obtidos através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^8 ; 2: 10^7 ; 3: 10^6 ; 4: 10^5 ; 5: 10^4 ; 6: 10^3 ; 7: 10^2 ; 8: 10^1 e C: controle positivo.

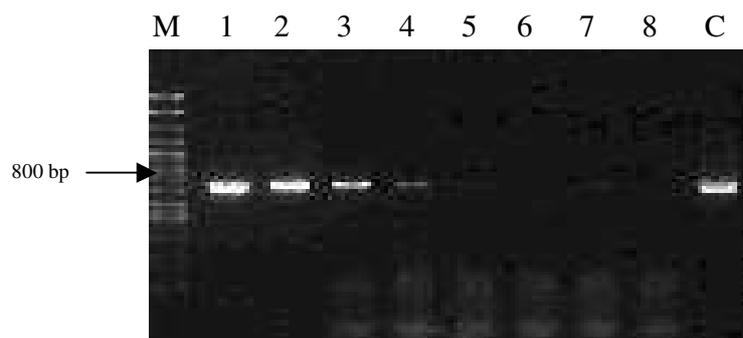


Figura 14. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. estertheticum*, através do método de extração B. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^8 ; 2: 10^7 ; 3: 10^6 ; 4: 10^5 ; 5: 10^4 ; 6: 10^3 ; 7: 10^2 ; 8: 10^1 e C: controle positivo.

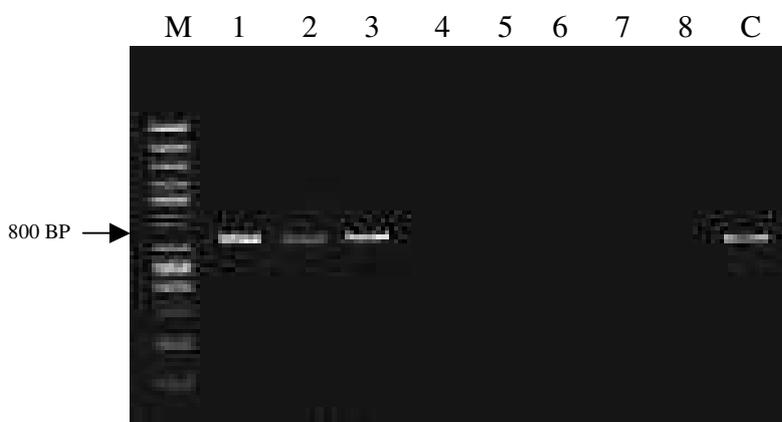


Figura 15. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. estertheticum*, através do método de extração C. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador peso molecular, 1: 10^8 ; 2: 10^7 ; 3: 10^6 ; 4: 10^5 ; 5: 10^4 ; 6: 10^3 ; 7: 10^2 ; 8: 10^1 e C: controle positivo.

b) Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16 S rDNA de *C. estertheticum* em carne embalada a vácuo

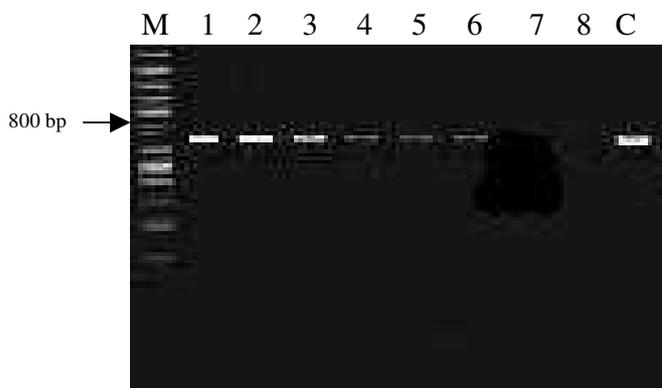


Figura 16. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. estertheticum*, através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^8 ; 2: 10^7 ; 3: 10^6 ; 4: 10^5 ; 5: 10^4 ; 6: 10^3 ; 7: 10^2 ; 8: 10^1 e C: controle positivo.

Kongmuang et al.(1994) afirmam que o custo é considerado um fator importante na escolha da metodologia. Os métodos B e C, além de serem econômicos, apresentam similaridade nos resultados.

Dickinson et al. (1995) também verificaram, em diferentes amostras, a similaridade entre dois métodos de extração de DNA. No primeiro, para lisar as células e solubilizar as amostras, utilizava-se um tampão com proteinase K. No segundo, utilizavam-se tolueno e mutanolisina para a lise celular e tiocinato de guanidina para a solubilização. Em ambos os métodos, o DNA era extraído com isopropanol. Os resultados, entre os dois métodos de extração mostraram-se semelhantes.

Lagatolla et al. (1996), ao realizarem PCR para a detecção de salmonelas, provenientes de diferentes materiais clínicos e conservadas em meio de Luria-Bertani, compararam dois métodos de extração de DNA. O primeiro, com fenol-clorofórmio; o segundo, com tratamento por meio de calor a 95°C/10min. Após uma primeira etapa idêntica, com a utilização de lisozima, duodecil sulfato e proteinase K, da mesma forma, não observaram diferenças entre as metodologias.

Florês et al. (2001) compararam extração, por tratamento térmico e por fenol-clorofórmio, em amostras de 100 ovos de galinhas contaminados com *Salmonella enterica sorovar typhimurium*, em fase estacionária. Concluíram que a metodologia de extração de DNA pelo fenol-clorofórmio foi mais efetiva na recuperação de salmonelas em ovos tanto com casca (72%) quanto sem casca (86%). Nesse trabalho também foi observado que método de extração, através de tratamento térmico, não era eficiente para extração de DNA.

Observa-se, na **Figura 16**, que a detecção do *C. estertheticum*, inoculado em carne embalada a vácuo e armazenada a 4°C, foi possível pelo método de extração A com uma população mínima de até 10³ UFC/g de carne. Assim, verificou-se que o método de extração pelo “High Pure DNA kit” foi o único a detectar *Clostridium estertheticum* em carne.

Helps et al. (1999) fizeram um trabalho similar, inoculando populações de 10^1 a 10^7 UFC/g de *C. estertheticum* em carne bovina embalada a vácuo e utilizaram “High Pure DNA kit” de extração para detecção pela PCR. Verificaram que a sensibilidade de detecção foi de 10-1000 UFC/g, o mesmo encontrado no presente trabalho.

Broda et al. (2003) averiguaram a sensibilidade da técnica PCR em relação à detecção de *C. estertheticum* em carnes embaladas a vácuo, utilizando “Kit HighPure DNA”. Determinaram o limite de 10^4 UFC/g para amostras não enriquecidas e de 10^2 UFC/g para amostras enriquecidas.

Observa-se, nas **Figuras 20 e 21**, que *C. gasigenes* inoculados em carne embalada a vácuo e armazenada a 4°C foi possível detectar uma população mínima entre 10^5 e 10^6 UFC/g de carne pelos métodos de extrações A e B, respectivamente. Não foi possível a detecção, através dos métodos C e D. Notou-se similaridade nos resultados obtidos por Broda et al. (2003), os quais detectaram 10^4 UFC/g de *C. gasigenes* em carnes embaladas a vácuo utilizando, também, o “High Pure DNA kit”.

A aplicação da técnica da PCR diretamente em alimentos, material clínico ou cultivos tem sido possível, mas determinados procedimentos de extração incrementam seu desempenho, uma vez que diferentes substâncias presentes nas amostras clínicas, tais como: concentrações elevadas de proteínas, íons cálcio ou componentes de meios de cultivo, podem inibir a técnica (ROSSEN et al., 1992). Esses compostos, presentes na carne, são constituintes que poderiam causar interferências na extração de DNA. Estas, por sua vez, poderiam ocasionar a ineficácia dos métodos de extração direta em carne bovina embalada a vácuo (métodos B, C e D). Dessa forma, indica-se a utilização do método A para detecção, pela técnica PCR, de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo.

A utilização do “High Pure DNA kit” mostrou o melhor resultado na detecção de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* tanto para caldo PYGS quanto em carne

embalada a vácuo; fato que pode estar relacionado à utilização de filtros e às etapas de lavagem removedoras de partículas interferentes, além do uso de lisozima e proteinase K para a lise celular.

Os métodos de extração B e C apresentaram bons resultados com culturas de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em caldo de enriquecimento onde se encontra uma população em torno 10^{7-8} UFC/mL. Nessas condições, os métodos B e C apresentam vantagens econômicas em relação ao método A.

a) Perfis dos géis de agarose do produtos da PCR do gene 16 S rDNA de *C. gasigenes* em caldo PYGS

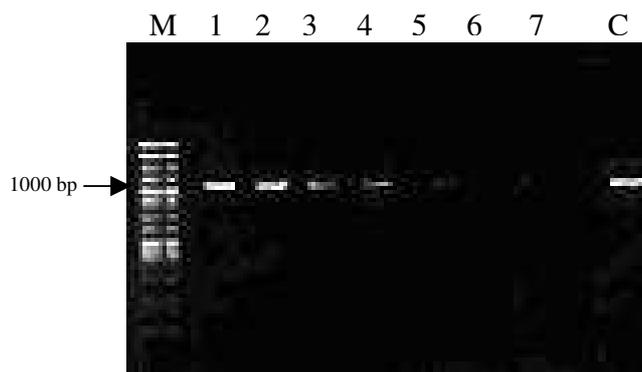


Figura 17. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. gasigenes*, através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo.

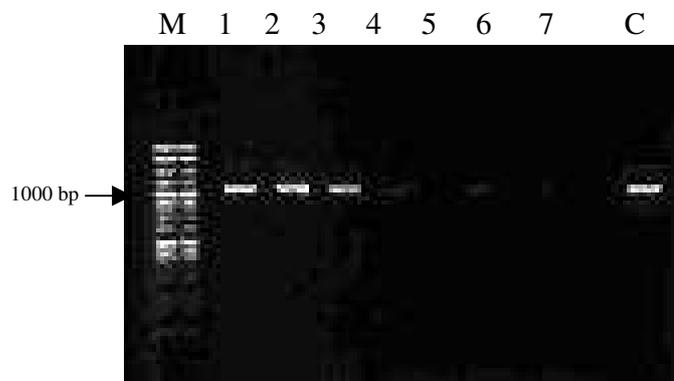


Figura 18. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. gasigenes*, através do método de extração B. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo.

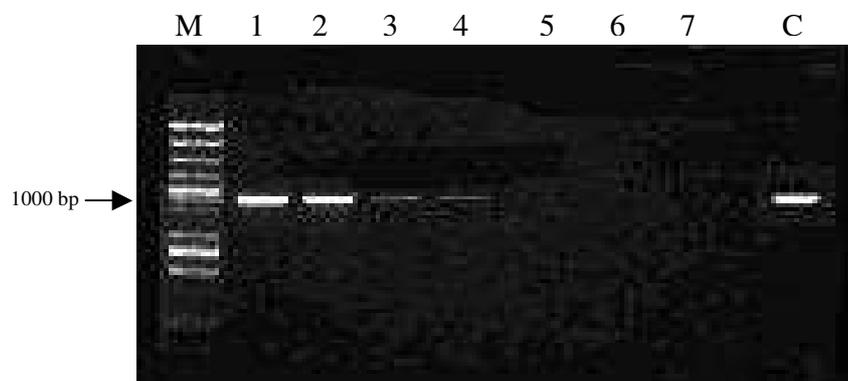


Figura 19. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. gasigenes*, através do método de extração C. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo.

b) Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16 S rDNA de *C. gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo

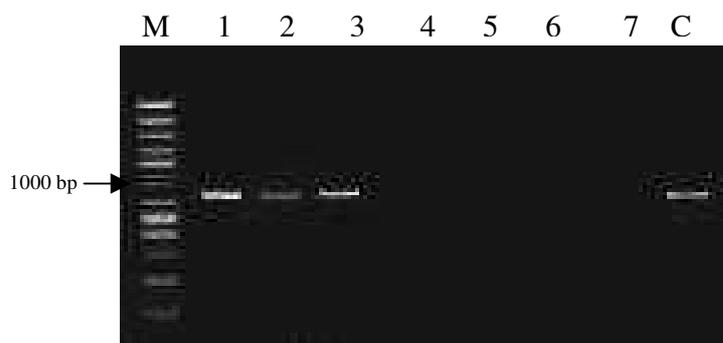


Figura 20. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S rDNA de *C. gasigenes*, através do método de extração A. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo.

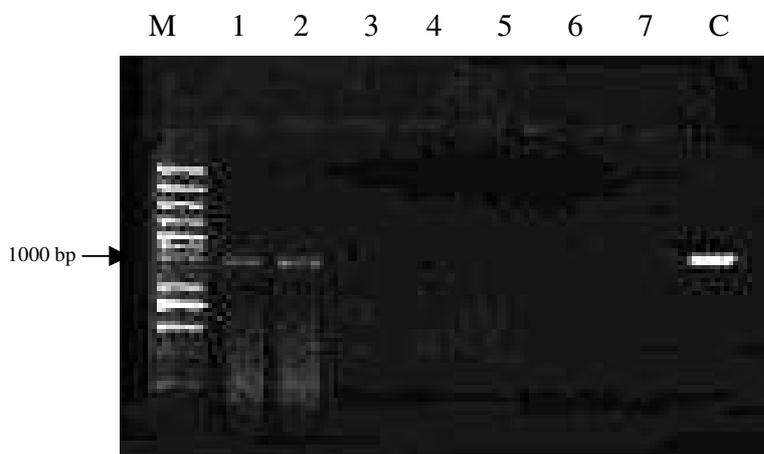


Figura 21. Perfis dos géis de agarose dos produtos da PCR do gene 16S de *C. gasigenes*, através do método de extração B. A contagem de bactérias, por reação de PCR, está representada nas colunas a seguir: M: marcador de peso molecular, 1: 10^7 ; 2: 10^6 ; 3: 10^5 ; 4: 10^4 ; 5: 10^3 ; 6: 10^2 ; 7: 10^1 e C: controle positivo.

5.2 Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* no ambiente de empresa de abate bovino e de processamento de carne resfriada embalada a vácuo

5.2.1 Empresa A

5.2.1.1. Coleta 1

Nas **Tabelas 3 e 4**, são apresentados os resultados obtidos a partir dos ensaios de detecção pela técnica da PCR e do isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de ambientes e de carnes embaladas a vácuo provenientes da primeira coleta de amostras da Empresa A, localizada no interior do estado de São Paulo.

Em todas as amostras avaliadas utilizando-se a técnica PCR direta (sem enriquecimento) para detecção da presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, os resultados foram negativos.

Através da técnica de isolamento A (item 4.2.5.1), foi possível o isolamento de *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 28,85% (15/52) das amostras. O isolamento ocorreu em amostras de piso e fezes do curral, piso e ralo do box de atordoamento, canaleta de sangria, pele e pata de animal (após a sangria), piso e ralo da sala de abate, rolete da retirada do couro, carcaça (após a retirada do couro), serra elétrica divisora da carcaça, intestino, ralo e piso do corredor da câmara fria, evaporador da câmara fria e embaladora a vácuo.

Pela técnica de isolamento B com a utilização da esponja como amostra, sem choque térmico (item 4.2.5.2) isolou-se apenas em 7,69% (4/52) das amostras (fezes do curral, canaleta de sangria, piso da sala de abate e intestino do animal) *Clostridium* sp. psicrotolerantes.

Dos clostrídios isolados, através das técnicas A e B, apenas um isolado (proveniente da amostra da serra elétrica divisora da carcaça) foi identificada como *C. estertheticum*. Nesta amostra, não foi detectado a presença de *C. estertheticum* pela técnica de PCR direta, mas obteve-se isolamento do mesmo

através da técnica de isolamento A, podendo ser atribuído à baixa população do microrganismo na amostra direta, uma vez que a sensibilidade da técnica de PCR direta é em torno de 10^3 UFC/mL.

No ambiente de um matadouro-frigorífico, clostrídios podem ser encontrados em baixas populações, podendo ocorrer tanto na forma vegetativa como na esporulada. Apesar das etapas enriquecimento e isolamento prolongarem o tempo necessário para a detecção, a introdução de cada uma delas permite um aumento da sensibilidade na técnica de PCR. Além disso, a utilização da etapa de enriquecimento promove a germinação dos esporos e, conseqüentemente, a melhoria no rendimento da extração do DNA (SCHEU et al., 1998).

Ao contrário da técnica de isolamento A, não foi isolado *C. estertheticum* da amostra de meia carcaça pela técnica de isolamento B. Como nesta técnica não se aplica choque térmico, o crescimento de outros microrganismos não esporulados, presentes na amostras, pode ser esperado. Dessa forma, houve o favorecimento de uma competição microbiana, o que pode ter dificultado o crescimento de *C. estertheticum*. Sathish & Swaminathan (2008) também utilizaram choque térmico (80°C/10min), no isolamento de *C. chauvoei* em amostras coletadas em matadouros-frigoríficos de abate bovino e também conseguiram obter isolamento de clostrídios.

Em relação às fontes de contaminação ambiental, deve-se destacar a importante participação da serra elétrica utilizada no corte e na obtenção da meia carcaça. A ocorrência de *C. estertheticum* revela o alto risco de contaminação cruzada nessa etapa, devida à grande quantidade de carcaças que é processada ao longo do dia e à baixa frequência da higienização do equipamento, que ocorre apenas no final do dia. A contaminação do equipamento pelo acúmulo de resíduos (gordura, sangue, carne, osso), pode favorecer a formação de biofilmes microbiano (JOHNSEN et al., 2006).

Nas 52 amostras coletadas e avaliadas pela técnica de PCR direta e também pelas técnicas de isolamento A e B, não foi verificada a ocorrência de *C. gasigenes*.

Nos resultados apresentados na **Tabela 4**, observa-se que *C. estertheriticum* e *C. gasigenes* não foram detectados em amostras de carne bovina resfriada embalada a vácuo utilizando-se a técnica de detecção direta por PCR, bem como a técnica de isolamento com enriquecimento. No entanto, foram isolados *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 37,5% (6/16) das amostras (2 de contrafilé, 1 de miolo da alcatra, 2 de filé-mignon e 1 de ponta de contrafilé). Dentre *Clostridium* sp. psicrotolerantes isolados podem serem detectados *C. frigidicarnis*, *C. algidixylanolyticum*, *C. botulinum* tipo E e cepas não proteolíticas do tipo B e F, entre outros (LAWSON et al., 1994; PHILIPS, 1996; BRODA et al., 2000).

Tabela 3. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 1.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Parede (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 3. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 1 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|----------------------|-----|------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|
| | | C.e | C.g. | C. | C. e. | C. g. | C. | C. e. | C. g. |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Corredor câmara fria | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C.= *Clostridium sp.*; C.e. = *Clostridium estertheticum*; C.g. = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 4. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 1.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|-----|------|--------------|-------|-------|
| | C.e | C.g. | C. | C. e. | C. g. |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C.=*Clostridium* sp.; C.e. = *Clostridium estertheticum*; C.g. = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente
 PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 12).

5.2.1.2. Coleta 2

Na segunda coleta da Empresa A (**Tabela 5**), encontrou-se *C. estertheticum*, pela técnica de PCR direta, em 3,85% (2/52) das seguintes amostras: piso do curral e carcaça (após a retirada do couro). Boerema et al. (2003) detectaram-no, também, em piso do curral, por meio de PCR direto. No Brasil, MESQUITA et al. (2006), encontraram, pela técnica de PCR direto, *C. estertheticum* em 11% (27/230) de superfícies de meias-carcaças resfriadas, provenientes de matadouros-frigoríficos localizados em oito Estados da Federação. De modo semelhante à coleta anterior, nesta também não foi observada presença de *C. gasigenes* nas 52 amostras coletadas, pela técnica de PCR direta e, ainda, pelas técnicas de isolamento A e B.

A partir da técnica de isolamento A, que utiliza choque térmico, isolaram-se clostrídios psicotolerantes em 38,46% (20/52) das amostras coletadas; enquanto

que, pela metodologia B, isolaram-se apenas em 11,53% (6/52). Nessa segunda coleta, por meio da técnica de isolamento A, obteve-se um índice maior (38,46%) de amostras de *Clostridium* sp. positivas do que em relação à coleta 1, que atingiu 28,85%.

C. estertheticum foi isolado, pela técnica de isolamento A, em duas amostras (3,85%): carcaça (após a retirada do couro) e rolete de retirada do couro. Nessas duas amostras, através da técnica de PCR direta, não foi detectado o microrganismo. Esse fato pode estar associado à baixa população (e, portanto, a pouca sensibilidade à detecção por PCR) ou, mesmo, à presença, no equipamento, de resíduos (sangue, gordura, areia, pêlos) prejudiciais à técnica de PCR (SCHEU et al., 1998). Já nas amostras onde foram detectados *C. estertheticum* pela PCR direta, sem enriquecimento (fezes do curral e carcaça depois de retirada do couro), não houve isolamento pelas técnicas A e B; isso pode ter ocorrido provavelmente devido à morte das células, à interferência de sujidades ou à presença de microbiota contaminante competitiva associada à falta de seletividade do meio de cultura utilizado (SMALLA et al., 1993).

Em relação às fontes de contaminação ambiental, também se deve destacar a participação do rolete na retirada do couro. A ocorrência positiva de *C. estertheticum*, nesse ponto, revela o alto risco de contaminação cruzada nessa etapa, pois uma grande quantidade de carcaças é processada ao longo do dia e a higienização do equipamento acaba sendo realizada apenas no seu final, tal como acontece com a serra elétrica. Ainda há, no rolete de retirada do couro, acúmulo de resíduos (gordura, sangue, carne, osso), os quais propiciam a formação de biofilmes microbiano, assim como acontece na serra elétrica (RODE et al., 2007).

Nas amostras de cortes de carne embalada a vácuo, analisadas nessa segunda coleta (**Tabela 6**), não foram detectados e isolados *C. estertheticum* e *C. gasigenes*. No entanto, foram isolados *Clostridium* sp. psicrotolerantes em contrafilé, filé-mignon e ponta de contrafilé, de modo semelhante ao ocorrido na primeira coleta.

Tabela 5. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 2.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Parede (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | + | - | + | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 5. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 2 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|----------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Corredor câmara fria | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 6. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 2.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente
 PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 12).

5.2.1.3. Coleta 3

Na terceira coleta (**Tabela 7**), encontrou-se, pela técnica da PCR direta, um maior número (5/52) de amostras positivas para *C. estertheticum* em relação às coletas anteriores. Isso ocorreu em amostras de fezes, rolete, serra elétrica divisora da carcaça e evaporador da sala de desossa.

Assim como nas coletas anteriores, não houve detecção de *C. gasigenes* em todas as amostras.

Pela técnica de isolamento A, detectaram-se clostrídios psicrotolerantes em 42,31% (22/52) das amostras; enquanto que, pela técnica B, detectaram-se em 9,61% (5/52). O grande número de *Clostridium* sp. isolados indica falhas no programa de higienização da linha de processamento de carne bovina. Essa falha já havia sido observada por Macedo e Sands (2005), que identificaram a

predominância de bactérias relacionadas à contaminação fecal e de bactérias originárias do pêlo dos animais, em ambientes frigoríficos de bovinos no Brasil.

Dentre os *Clostridium* sp. psicotolerantes isolados pela técnica A, duas cepas foram identificadas (através da técnica de PCR) como *C. estertheticum*, sendo originários do rolete da retirada do couro e da serra elétrica divisora da carcaça. Nesses dois pontos, em coletas anteriores, já havia sido isolado o microrganismo: serra do corte de carcaça, na primeira coleta; rolete da retirada do couro, na segunda coleta.

A contaminação repetida, nesses itens, pode indicar falhas na higienização dos equipamentos, uma vez que as configurações destes facilitam o acúmulo de sujidades e a formação de biofilmes, sendo necessária uma maior frequência de higienização; o que não ocorre na prática, pois a velocidade de produção não permite paradas para este procedimento.

Observa-se, na **Tabela 7**, que o *C. estertheticum* foi isolado, pela técnica A, no rolete da retirada do couro; entretanto, não foi detectado por meio da técnica de PCR direta. Isso provavelmente ocorreu devido à baixa população do microrganismo em relação ao nível de detecção pela técnica de PCR direta. Na amostra da serra elétrica divisora da carcaça, obteve-se concordância nos resultados, tanto pela técnica de PCR direta quanto pela técnica de isolamento A, indicando população mais elevadas nestes equipamentos.

C. estertheticum foi detectado nas fezes, o que indica possível fonte de contaminação e, conseqüentemente, propagação para dentro da indústria através das patas e couro do animal, atingindo o rolete de retirada do couro e, posteriormente, a serra elétrica divisora da carcaça. Roça (2004) afirma que a contaminação da carne ocorre por contato com a pele, pêlos, patas, conteúdo gastrintestinal, leite do úbere dos animais e, ainda, equipamentos, mãos e roupas de operários, água utilizada para lavagem das carcaças, equipamentos e ar dos locais de abate e armazenamento

C. estertheticum foi detectado, por PCR direta, na amostra de evaporador da sala de desossa; porém, não foi isolado utilizando as técnicas A e B, com enriquecimento. Esse resultado é relevante, pois evidencia a potencial contaminação desse ambiente pela circulação do ar através do evaporador, alcançando os cortes e as carcaças expostas nas esteiras. Em particular, esse equipamento (evaporador), no momento da coleta, apresentava-se com muito acúmulo de sujeira (poeira, terra, gordura), o que pode ter contribuído para a presença do microrganismo e da possível formação de biofilme.

Na **Tabela 8**, observa-se a detecção e o isolamento de *C. estertheticum* em uma amostra de contrafilé embalada a vácuo. Essa concordância nos resultados pode estar relacionada à presença do microrganismo na forma vegetativa, devido às condições de anaerobiose na embalagem. A contaminação desta amostra pode ser proveniente do rolete da retirada do couro e da serra elétrica divisora da carcaça, nos quais também foram isolados *C. estertheticum* ou, até mesmo, do evaporador da sala de desossa.

Mesquita et al. (2006) detectaram, pela técnica da PCR, a presença de *C. estertheticum* em 14% (27/193) das amostras de carne bovina embalada a vácuo, sendo que 13 amostras eram provenientes do Estado de São Paulo, 5 de Goiás, 5 do Mato Grosso, 1 do Mato Grosso do Sul e 1 da Bahia.

Nesta coleta, verificou-se que 62,5% (10/16) das amostras de carne embalada a vácuo continham *Clostridium* sp. O alto índice pode revelar risco microbiológico no produto final, já que dentro do gênero *Clostridium* sp., podem-se encontrar microrganismos patogênicos, como *C. botulinum*. O grande número de amostras de carne contaminadas reflete a alta porcentagem de amostras ambientais que continham *Clostridium* sp.

Tabela 7. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 3

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Parede (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 7. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 3 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|----------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 8. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 3.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | + | - | + | + | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C.=*Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente
 PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 12).

5.2.1.4. Coleta 4

Na **Tabela 9**, verifica-se que foi detectado, pela técnica de PCR direta, *C. estertheticum* em 11,54% (6/52) das amostras da quarta coleta – Empresa A; sendo duas amostras do rolete de retirada do couro, duas da serra elétrica divisora da carcaça, ralo da câmara fria B e evaporador do corredor. Nas amostras analisadas, não foram detectados e isolados *C. gasigenes* em nenhuma das amostras analisadas.

Por meio das técnicas de isolamento A e B, observou-se a ocorrência de *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 44,23 (24/52) e em 15,38% (8/52) das amostras, respectivamente. Das 24 amostras positivas para *Clostridium* sp., pela técnica de isolamento A, *C. estertheticum* foi identificado em duas amostras no piso da câmara fria B e na superfície de carcaça dessa câmara fria.

Nessa coleta, também foi detectado *C. estertheticum* no rolete de retirada do couro e na serra elétrica divisora da carcaça, através da técnica de PCR direta. Fato importante a destacar refere-se à modificação dos procedimentos de higienização após a coleta, pois esta se tornou mais rigorosa devido à utilização de ácido peracético a 500mg/L, agente sanitizante que é bastante efetivo na destruição de esporos de microrganismos (KUNIGK et al., 2001).

No evaporador localizado no corredor da câmara fria foi detectado *C. estertheticum*, pela técnica da PCR direta. Esse evaporador, assim como aquele da sala de desossa da terceira coleta, apresentava sujidades (poeira, gordura) que, provavelmente, contribuíram para a retenção de esporos do microrganismo e, mais remotamente, de células vegetativas viáveis, em função do reduzido potencial de oxi-redução do ambiente formado e da baixa temperatura no local. A presença de *C. estertheticum*, na superfície da meia carcaça (localizada na câmara fria B) e no piso desta câmara, pode estar associada à contaminação cruzada devido ao rolete utilizado na retirada do couro, à serra elétrica divisora da carcaça ou do evaporador do corredor da câmara fria, locais estes onde as carcaças ficaram expostas por algum tempo antes do ingresso nas câmaras frias. Para o piso da câmara fria B, obteve-se concordância nos resultados, encontrando-se *C. estertheticum* tanto pela técnica da PCR direta como pelo isolamento através da metodologia A.

Nesta coleta, detectou-se, por meio da técnica de PCR direta, *C. estertheticum* em três amostras de carne bovina embalada a vácuo tipo exportação (duas de contrafilé e uma de filé-mignon). O isolamento do microrganismo ocorreu apenas para a amostra de contrafilé (**Tabela 10**). A presença do microrganismo, no produto final, revela a falta de controle dentro da indústria. A contaminação de *C. estertheticum*, na peça de contrafilé, pode ter sido proveniente de contaminação cruzada do rolete de retirada do couro ou da serra elétrica utilizada para dividir as carcaças.

Tabela 9. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 4.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Parede (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 9. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 4 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|----------------------|-----|------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|
| | | C.e | C.g. | C. | C. e. | C. g. | C. | C. e. | C. g. |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C.= *Clostridium* sp.; C.e. = *Clostridium estertheticum*; C.g. = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 10. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 4.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | + | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | + | - | + | + | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | + | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente
 PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 12).

5.2.1.5. Coleta 5

Na quinta coleta (**Tabela 11**) foi detectado, pela técnica da PCR, *C. estertheticum* nas amostras do rolete utilizado na retirada do couro, da mesa de vísceras e do piso da câmara fria A.

Nesta coleta, assim como nas anteriores, em nenhuma amostra foi detectado e isolado *C. gasigenes*.

A sala de abate pode ser considerado um local potencial para presença de *C. estertheticum*, o que foi encontrado em equipamentos (serra elétrica, rolete de retirada do couro) e superfície de carcaças em diferentes coletas nesta empresa.

Na mesa de vísceras foi detectada, pela primeira vez nessa empresa, a presença de *C. estertheticum*. Órgãos do animal que contêm material fecal

potencialmente contaminado (intestino grosso, delgado), entram em contato com essa superfície provocando sua contaminação.

As carcaças podem ser contaminadas por material fecal, conteúdo abdominal e sujidades do couro durante o processo de abate. Outras fontes adicionais de contaminação cruzada são as seguintes: equipamentos, utensílios, superfícies, contato humano e contato carcaça-carcaça (HUFFMAN, 2002).

A utilização da técnica de isolamento A, permitiu a obtenção de 32,69% (17/52) de amostras positivas para *Clostridium* sp. psicrotolerantes; enquanto que, pela técnica de isolamento B, apenas 5,76% foram positivas.

Em duas amostras foram isolados, pela técnica de isolamento A, *C. estertheticum* - no rolete de retirada do couro e na serra elétrica divisora da carcaça. Esses resultados são semelhantes aos que foram encontrados na primeira, segunda e terceira coletas. Assim, fica em evidência o aspecto negativo da utilização de equipamentos cuja configuração física facilita a deposição de sujidades de difícil remoção, levando à conseqüente adoção de programas de higienização diferenciados (maior freqüência e controle).

A ocorrência *C. estertheticum* nos equipamentos e nos utensílios utilizados para o processamento de carne bovina embalada a vácuo demonstram que a empresa estudada necessita maior rigor na aplicação de práticas de higienização de equipamentos e de utensílios, bem como do fortalecimento das boas práticas de fabricação (BPF).

Tabela 11. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 5.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Parede (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 11. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 5 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|----------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Corredor câmara fria | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo e piso | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de triparia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente; PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Nesta coleta não foi verificada a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* por detecção por PCR, apesar do isolamento do microrganismo em dois equipamentos e nas amostras de carne embalada a vácuo. Porém, 50% das amostras de carne bovina embalada a vácuo (duas amostras de contra-filé, uma de miolo de alcatra, três de filé-mignon e duas de ponta de contrafilé) continham *Clostridium* sp. psicotolerantes (**Tabela 12**).

Tabela 12. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa A – Coleta 5.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente
 PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 12).

5.2.1.6 Comparação dos resultados positivos para detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, em função das técnicas analíticas empregadas nas amostras da empresa A

Está representado, na **Figura 22**, o gráfico da porcentagem de amostras positivas, por meio das técnicas de detecção e isolamento de *C. estertheticum* e isolamento de *Clostridium* sp., em ambientes de plantas de abates de bovinos e de processamento em carne bovina resfriada embalada a vácuo, na Empresa A, relativo às cinco coletas.

Nessa empresa, foram isolados *C. estertheticum* em todas as coletas. Apesar da baixa porcentagem de isolamento de *C. estertheticum* (máximo de 5,7%), a presença do microrganismo nos ambientes da Empresa A proporcionou a contaminação do produto final na terceira e quarta coletas, como pode ser observado na **Figura 23**. Essa disseminação, ao longo da linha de processamento e no produto final, evidencia a dificuldade de controle e aplicação de programas, relacionados à higienização, que devem ser rigorosos com a implantação de procedimentos operacionais padronizados.

Na **Figura 22**, observa-se que, pela técnica de isolamento A, houve uma porcentagem (entre 28,85 e 44,23%) superior de isolados de *Clostridium* sp. psicotolerantes em relação à porcentagem (entre 1,92 e 15,38%) obtida por meio da técnica de isolamento B, em todas as coletas.

Além disso, obteve-se isolamento de *C. estertheticum* apenas pela técnica de isolamento A, fato este talvez relacionado à utilização do choque térmico, selecionando (no inóculo inicial) apenas microrganismos esporulados. Durante a inoculação, sob baixas temperaturas e anaerobiose por longo tempo (52 dias), há o favorecimento do crescimento do clostrídios psicotolerantes anaeróbios estritos. Por sua vez, a técnica de isolamento B (sem choque térmico) pode permitir o crescimento de outros microrganismos não esporulados presentes nas amostras, favorecendo a competição microbiana contrária ao crescimento de *Clostridium* sp. psicotolerantes - inclusive de *C. estertheticum*.

Na **Figura 23**, pode-se observar que houve isolamento de *C. estertheticum* de duas amostras de carne bovina embalada a vácuo, sendo uma na terceira coleta e a outra na quarta. Ambas as amostras eram de contrafilé. Apesar do número de amostras positivas serem reduzidos, pode haver risco quanto à qualidade do produto e, também, perdas econômicas para a indústria, uma vez que a presença de um produto com deterioração “blown-pack” produz uma imagem negativa em relação à qualidade e segurança do produto final.

Está representado, na **Figura 24**, o gráfico da distribuição da presença de *C. estertheticum* em ambientes e equipamentos, pelas técnicas de detecção direta por PCR e isolamento A, em amostras da empresa A, nas cinco coletas. Os locais que apresentaram contaminação foram: serra elétrica divisora da carcaça, piso do curral, rolete utilizado para retirada do couro, carcaça (após retirada do couro), fezes do curral, evaporador da sala de desossa e corredor da câmara fria, piso e superfície e meia carcaça da câmara fria. O isolamento do *C. estertheticum* foi obtido em 60% (3/5) das coletas realizadas, sendo observado em serra elétrica divisora da carcaça, rolete da retirada do couro; e em 20% (1/5) das coletas realizadas no piso e superfície de carcaça da câmara fria.

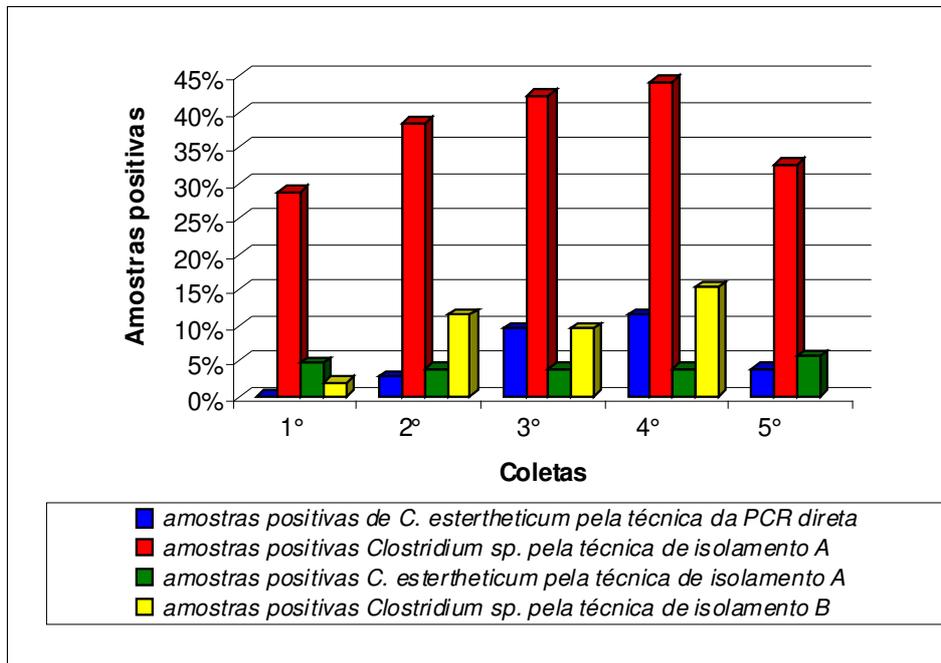


Figura 22. Distribuição de amostras positivas, pela detecção direta por PCR e isolamento A e B de *C. estertheticum*, em ambientes do abatedouro e processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo, da Empresa A, nas cinco coletas.

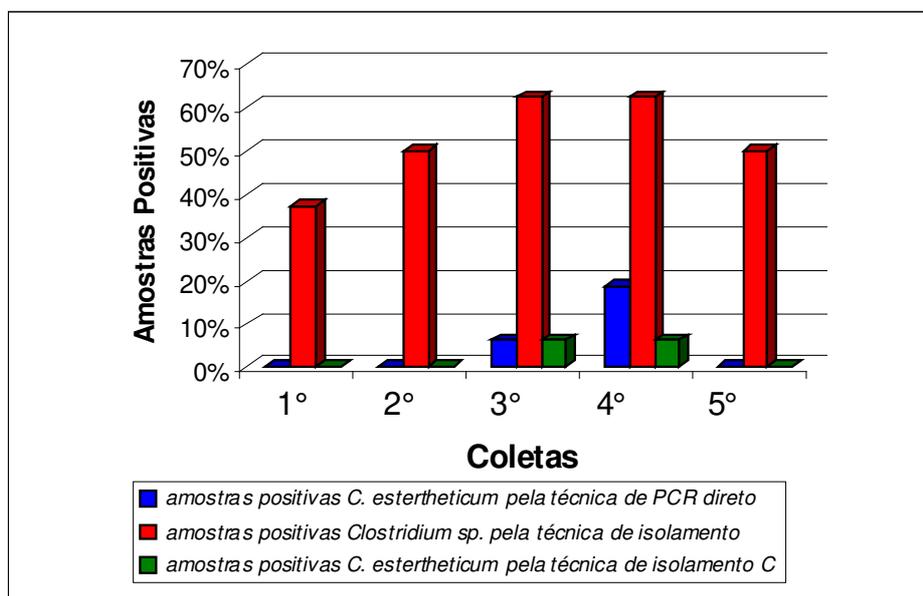


Figura 23. Distribuição de amostras positivas, pela detecção direta por PCR e isolamento C de *C. estertheticum*, em carne bovina resfriada embalada a vácuo, da Empresa A, nas cinco coletas.

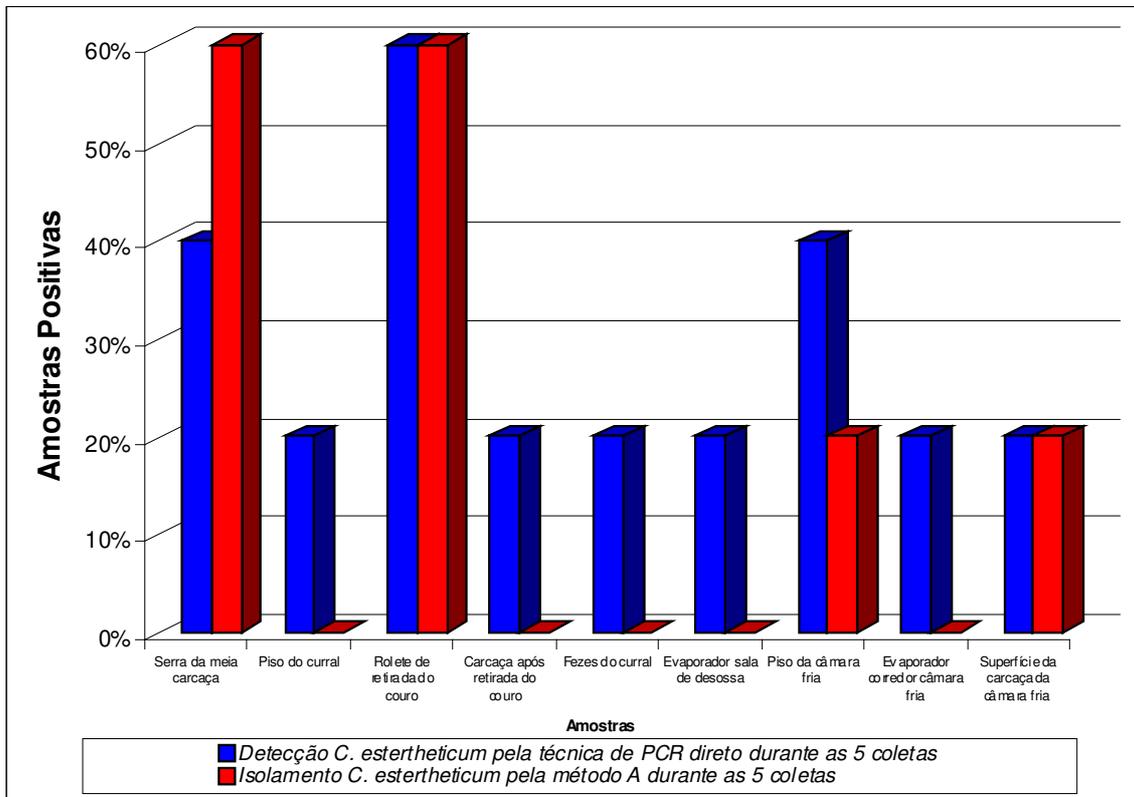


Figura 24. Distribuição da frequência *C. estertheticum*, pelas técnicas de detecção direta e isolamento A, em amostras de ambientes da Empresa A, nas cinco coletas.

5.2.2 Empresa B

5.2.2.1 Coleta 1

Na **Tabela 13**, estão os resultados obtidos da detecção (pela técnica de PCR direta) e do isolamento (pelas técnicas A e B) de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*. Na primeira coleta da Empresa B, a presença desses clostrídios não foi constatada em nenhuma das amostras.

A utilização da técnica de isolamento A, permitiu isolar *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 33,33% (20/60) das amostras coletadas, sendo obtidos resultados positivos para amostras de: fezes do curral, canaleta de sangria da sala de abate, piso da sala de abate, pele e pata do animal (após sangria), rolete de retirada do couro, evaporador na sala de abate, serra elétrica divisora da carcaça, piso da câmara fria pulmão, embaladora a vácuo, evaporador da sala de desossa e, ainda, intestino. A utilização da técnica de isolamento B, permitiu isolar *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 20% das amostras (12/60), que também haviam sido obtido utilizando-se a técnica A.

Na **Tabela 14**, estão os resultados obtidos da detecção, pela técnica de PCR direta, e do isolamento dos microrganismos nas amostras de carne embalada a vácuo tipo exportação. Não foram detectados, por nenhuma das técnicas, *C. estertheticum* e *C. gasigenes*. Entretanto, foram isolados *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 31,25% (5/16) das amostras de carne bovina embalada a vácuo.

Apesar de não haver isolados de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, obteve-se muitos isolados de *Clostridium* sp., dentre os quais podem estar cepas patogênicas, como as de *C. botulinum* não proteolíticos (Grupo II) (HIELM, et al., 1998; HYYTIÄ, et al., 1999; DAVIS, et al., 2000; LINDSTRON et al., 2001). Alguns trabalhos já isolaram *Clostridium* sp. de matadouros-frigoríficos, entre eles destaca-se *C. perfringens* (FRANSEN, et al., 1996; LOVLAND e KALDHUSDAL, 2001)

Tabela 13. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 1.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |

(continua)

Tabela 13. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 1 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|---|--------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 13. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 1 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|-----------------------------------|------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 14. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 1.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente; PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne Figura 12.

5.2.2.2 Coleta 2

Na segunda coleta da Empresa B (**Tabela 15**), a presença de *C. estertheticum*, pela técnica de PCR direta, foi observada em 11,66% (7/60) das amostras, a saber: serra elétrica divisora da carcaça, ralo da câmara fria B, piso e carcaça da câmara fria pulmão, esteira de corte e embaladora a vácuo.

Clostridium sp. psicotolerantes foram isolados em 35% (21/60) das amostras, pela técnica de isolamento A: piso e fezes do curral, piso e ralo do box de atordoamento, pele e pata do animal (após sangria), rolete da retirada do couro, mesa de vísceras, serra elétrica divisora da carcaça, ralo e piso da câmara fria B, piso da câmara fria pulmão, embaladora a vácuo e intestino. Por meio da técnica de isolamento B, foram isolados *Clostridium* sp. psicotolerantes em 15% (9/60) das amostras, sendo elas: fezes do curral, piso e ralo do box de atordoamento, pele e pata (após sangria), mesa de vísceras e ralo e, ainda, piso da câmara fria B.

Clostridium estertheticum foram isolados da serra elétrica divisora da carcaça e da embaladora a vácuo através da técnica de isolamento A. A contaminação da serra elétrica divisora da carcaça também ocorreu, com frequência, na Empresa A (primeira, segunda, terceira e quinta coletas). Esses resultados confirmam a elevada participação dos equipamentos mencionados na contaminação cruzada, devido ao seu uso contínuo no corte das carcaças e à configuração física propícia ao acúmulo de sujidades (gordura, sangue, carne, osso).

A embaladora a vácuo também, pela elevada utilização, possibilita a contaminação cruzada dentro da indústria. A contaminação do equipamento por *C. estertheticum* pode ter origem na própria carne, uma vez que a contaminação foi observada em amostras coletadas nesse dia, da superfície de carcaças e do piso da câmara fria pulmão (local onde todas as carcaças permanecem antes da desossa).

Além disso, foram encontradas amostras positivas na esteira da sala de desossa, pela técnica de PCR direta; contaminada, provavelmente, por peças provenientes da câmara fria pulmão. Raucker et al. (2006) detectaram a presença de *C. estertheticum*, pela técnica PCR, em 12% (9/75) de amostras de esteiras da sala de desossa.

Na **Tabela 16**, observa-se a não detecção, por nenhuma das técnicas, da presença de *C. gasigenes* em amostras de carne embalada a vácuo, tipo exportação. No entanto, a detecção de *C. estertheticum*, pela técnica da PCR direta, ocorreu em 12,5% (2/16) das amostras.

Dentre as amostras de carne bovina embalada a vácuo avaliadas, *Clostridium* sp. psicotolerantes estavam presentes em 31,25% (5/16). Nessa 2ª coleta, obteve-se isolamento de *C. estertheticum* em uma amostra de contrafilé, destacando-se que a sua presença pode ter como origem a embaladora a vácuo.

A presença de *C. estertheticum* em contrafilé já havia sido detectada, também, na terceira e quarta coletas da empresa A, sendo tal corte o único até o momento em que se obteve o isolamento do microrganismo.

A presença de *C. estertheticum*, pela técnica da PCR direta, indica que a população é, no mínimo, na ordem de 2,0 log UFC/g. Segundo Bell et al. (2001), em cortes cárneos embalados a vácuo, com uma população inicial de 3,0 log UFC/cm² de *C. estertheticum*, o estufamento ocorre em 49 dias.

Não houve detecção e isolamento de *C. gasigenes* em amostras de ambientes, equipamentos e cortes cárneos, nessa coleta. Rosa et al. (2007) também não detectaram *C. gasigenes* em 50 amostras de ambientes e equipamentos analisados de dois matadouros-frigoríficos, localizados no Estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul.

Tabela 15. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 2.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 15. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 2 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|---|--------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | + | - | + | + | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 15. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 2 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|-----------------------------------|------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 16. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 2.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | + | - | + | + | - |
| Contrafilé | + | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente; PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne Figura 12.

5.2.2.3 Coleta 3

Na terceira coleta da Empresa B (**Tabela 17**), detectou-se o *C. estertheticum* - pela técnica de PCR direta - em 8,33% (5/60) das seguintes amostras: fezes do curral, rolete da retirada do couro, carcaça (após retirada do couro), serra elétrica divisora da carcaça e piso da câmara fria C. Nas fezes do curral já haviam sido encontrados *C. estertheticum* na segunda e terceira coletas da Empresa A. Borema et al. (2003) detectaram, pela técnica de PCR, a presença de *C. estertheticum* em duas amostras de fezes, obtendo o isolamento do microrganismo em uma delas. A presença do microrganismo nas fezes, em indústrias de diferentes regiões, reforça a importância das fezes como provável origem da contaminação dos matadouros-frigoríficos.

O rolete de retirada do couro e a serra elétrica divisora da carcaça também foram positivos em coletas anteriores e no frigorífico A; fato que reforça a propensão desses equipamentos à contaminação pelo microrganismo. A presença do microrganismo no piso da câmara fria também já havia sido detectada na coleta anterior e na quarta e quinta coletas da Empresa A. Barros et al. (2007) identificaram pisos e ralos como os principais pontos de contaminação por microrganismos indicadores em plantas de processamento de carnes. Nesta 3ª coleta, não foi isolado *C. estertheticum*, mas a presença de *Clostridium* sp. psicrotolerantes foi observada em 21,66% (13/60) e em 6,66% (4/60) das amostras, através das metodologias de isolamento A e B, respectivamente. Esses microrganismos foram observados nas seguintes amostras: fezes do curral, pele e pata do animal (após sangria), rolete da retirada do couro, mesa de vísceras, piso da câmara fria pulmão, serra elétrica divisora da carcaça e intestino

Verifica-se, na **Tabela 18**, que *C. estertheticum* e *C. gasigenes* não foram detectados, pela técnica da PCR, nem isolados pelas diferentes metodologias. No entanto, a presença de *Clostridium* sp. psicrotolerantes foi observada em 37,5% (6/16) das amostras, sendo duas de contrafilé, uma de miolo de alcatra, duas de filé-mignon e uma de ponta de contrafilé.

Tabela 17. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 3.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 17. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 3 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|---|--------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria C | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 17. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 3 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|-----------------------------------|------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 18. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 3.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente; PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne Figura 12.

5.2.2.4. Coleta 4

Na **Tabela 19**, são apresentados os resultados obtidos dos ensaios de detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras ambientais da quarta coleta realizada na Empresa B.

Por meio da técnica de PCR direta (sem enriquecimento), foram detectadas cinco amostras positivas para *C. estertheticum* - serra elétrica divisora da carcaça, piso da câmara fria pulmão (2 amostras), superfície de carcaça da câmara fria pulmão e evaporador da sala de desossa.

Nessa empresa, esta foi a terceira vez que detectou-se o microrganismo na serra que divide as carcaças. Assim, medidas devem ser tomadas quanto ao programa de higienização, sendo necessárias alterações, principalmente, em relação a sua frequência. Outro local, onde deve ser revisto o programa de higienização, é a câmara fria pulmão, pois foi detectado *C. estertheticum* (no piso ou superfície da carcaça) na segunda, terceira e quarta coletas, consecutivamente.

A presença de *C. estertheticum* no evaporador da sala de desossa revela um risco elevado, pois a contaminação pode espalhar-se pelo ambiente, atingindo esteiras e, conseqüentemente, peças de carne bovina que serão embaladas a vácuo.

Nesta coleta, foram detectadas, pela PCR, duas amostras positivas para *C. gasigenes* - do rolete de retirada do couro e da serra elétrica divisora da carcaça; fato que havia sido observado nas coletas anteriores e também na Empresa A. Em trabalho realizado por Borema et al. (2003), *C. gasigenes* foi detectado e isolado em pisos do curral, fezes e solo.

Através da técnica de isolamento A, foi detectado *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 45% (27/60) das amostras; enquanto que, pela metodologia B, 15% (9/60) das amostras foram positivas.

Nessa coleta, obteve-se o isolamento de ambos os microrganismos nas amostras do rolete de retirada do couro e da serra elétrica divisora da carcaça, sendo que o *C. gasigenes* foi isolado em duas amostras da serra elétrica e em duas do rolete da retirada do couro.

Na **Tabela 20**, estão os resultados obtidos nas análises das amostras de carne embalada a vácuo da quarta coleta. Pela técnica da PCR direta, foram detectadas duas amostras positivas para *C. estertheticum* (contrafilé) e duas para *C. gasigenes* (filé-mignon e ponta de contrafilé). *Clostridium* sp. psicotolerantes foram isolados em 37,5% (6/16) das amostras, sendo que uma continha *C. gasigenes* (filé-mignon) e a outra, *C. estertheticum* (ponta de contrafilé). Essa contaminação, provavelmente, ocorreu via equipamentos (rolete da retirada do couro e serra elétrica divisora da carcaça), onde também foram isolados os microrganismos. A contaminação do produto final indica falta de controle dos procedimentos de higiene durante o processo, prejudicando a sua qualidade e segurança.

Tabela 19. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 4.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | + | + | + | + | + | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | - | - | + | - | + | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 19. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 4 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|---|--------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | + | + | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | + | + | - | + | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria C | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 19. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 4 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|-----------------------------------|------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 20. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 4.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | + | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Contrafilé | + | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | + | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | - | - | + | - | + |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | + | + | + | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente; PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne Figura 12.

5.2.2.5 Coleta 5

Na **Tabela 21**, verificou-se a detecção, pela técnica da PCR direta, de *C. estertheticum* em 10% (6/60) das amostras da quinta coleta realizada na Empresa B, provenientes do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. As amostras positivas foram: rolete de retirada do couro, carcaça (após retirada do couro), serra elétrica divisora da carcaça, embaladora a vácuo e evaporador da sala de desossa. Não houve amostras positivas para de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* utilizando-se as técnicas de isolamento A e B.

Nesta coleta, apesar da Empresa B ter revisto os programas de higienização, foi detectado *C. estertheticum*, pela técnica da PCR, nos mesmos pontos observados em coletas anteriores. Por isso, ressalta-se a importância de estudos relacionados aos esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* visando o controle da contaminação através de procedimentos padronizados de higiene operacional.

A utilização da metodologia de isolamento A, permitiu o isolamento de *Clostridium* sp. psicotolerantes em 28,33% (17/60) das amostras coletadas; pela metodologia B, em apenas 8,33% (5/60) das amostras.

Na **Tabela 22**, estão os resultados obtidos da análise das amostras de carne embalada a vácuo, tipo exportação. Pela técnica da PCR direta e pelo isolamento não foi detectado, a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, no entanto, *Clostridium* sp. psicotolerantes foram isolados em 31,25% (5/16) das amostras.

Uma das formas de controle do “blown-pack” seriam a adoção de procedimentos para limitar a transferência de esporos de couros e fezes do animal para o interior da indústria. Além disso, deveria ser aperfeiçoado o programa de higienização, com aumento da frequência e eficiência dos processos de limpeza.

Tabela 21. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 5.

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|--|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Curral | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Fezes (25 g) | Curral | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Box de atordoamento | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Canaleta de sangria | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pele e pata do animal (após sangria) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso e ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Rolete de retirada do couro | Sala de abate | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Carcaça após retirada do couro (500 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mesa de vísceras (1600 cm ²) | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de abate | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 21. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 5 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|---|--------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Serra elétrica divisora da carcaça | Sala de abate | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Ralo | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria B | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria B | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície da carcaça (500 cm ²) | Câmara fria pulmão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Superfície esteira de corte (1600 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Pool superfície de cortes | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ralo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piso (900 cm ²) | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |

(continua)

Tabela 21. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras do processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 5 (continuação).

| Amostra (unidade de expressão) | Local | PCR | | Isolamento A | | | Isolamento B | | |
|-----------------------------------|------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Embaladora a vácuo | Sala de desossa | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Evaporador | Sala de desossa | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Intestino (25 g) | Sala de bucharia | - | - | + | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente

PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento A = utilização de 2 mL amostra, com choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 10); Isolamento B = utilização da esponja como amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 11).

Tabela 22. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de cortes de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Empresa B – Coleta 5.

| Amostra | PCR | | Isolamento C | | |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | + | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Contrafilé | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | - | - | - |
| Miolo de alcatra | - | - | + | - | - |
| Filé-mignon | + | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Filé-mignon | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | + | - | - | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |
| Ponta de contrafilé | - | - | + | - | - |

C. = *Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; +: presente; -: ausente; PCR = técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne Figura 12.

5.2.2.6 Comparação dos resultados positivos para detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, em função das técnicas analíticas empregadas nas amostras da empresa B

Na **Figura 25**, está representado o gráfico da porcentagem de amostras positivas, pelas técnicas de detecção e isolamento de *C. estertheticum*, em ambientes de abatedouros de bovinos e indústrias de processamento em carne bovina resfriada embalada a vácuo, na Empresa B, nas cinco coletas. Nessa empresa, foram isolados *C. estertheticum* na segunda e quarta coletas e *C. gasigenes* na quarta coleta. A presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, nos ambientes da empresa, podem ter propiciado a contaminação do produto final com *C. estertheticum* (na terceira coleta) e com *C. estertheticum* e *C. gasigenes* (na quarta coleta), de acordo com a **Tabela 26**.

Através da **Figura 25**, observa-se que, pela técnica de isolamento A, houve uma porcentagem superior de isolados de *Clostridium* sp. psicrotolerantes em relação à técnica de isolamento B, em todas as coletas. Além disso, obteve-se isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, pela técnica A, confirmando ser essa a metodologia mais adequada para o isolamento dos microrganismos.

Na **Figura 26**, está representada a freqüência da presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, pelas técnicas de detecção por PCR direta e isolamento, em amostras de cortes cárneos embalados a vácuo da Empresa B, durante as cinco coletas. Observou-se a presença de *C. estertheticum*, tanto pela técnica da PCR direta como pelo isolamento através do método B, na segunda e quarta coletas.

Na quarta coleta, destaca-se a detecção, pela técnica da PCR, e o isolamento, pela técnica A, do *C. gasigenes* em amostras da indústria e, também, nos cortes cárneos embalados a vácuo. Esse microrganismo não foi encontrado em nenhuma outra coleta das Empresas A e B. Observa-se, ainda, que em todas

as coletas houve um grande índice de *Clostridium* sp., indicando ausência de controle da higienização por parte da indústria (**Figura 26**).

Na **Figura 27**, está representado o gráfico da frequência da presença de *C. estertheticum*, pelas técnicas de detecção por PCR direta e isolamento B, em amostras da Empresa B, nas cinco coletas. Os locais onde foram detectados *C. estertheticum*, pela técnica da PCR, são os seguintes: serra elétrica divisora da carcaça, ralo e piso da câmara fria, superfície da carcaça da câmara fria, superfície da esteira de corte, embaladora a vácuo, fezes do curral, rolete utilizado para retirada da carcaça do couro, meia carcaça (após retirada do couro) e evaporador da sala de desossa.

O isolamento, pela técnica A, do *C. estertheticum* foi obtido em 40% (2/5) das coletas realizadas na serra elétrica divisora da carcaça e em 20% (1/5) das coletas realizadas no rolete utilizado para a retirada do couro.

C. gasigenes foi detectado, pela técnica da PCR direta, e isolado, pela técnica A, em 20% (1/5) das coletas realizadas na serra elétrica divisora da carcaça e no rolete utilizado para a retirada do couro (**Figura 19**). Esses dois equipamentos foram os únicos que apresentaram resultados positivos para o isolamento dos microrganismos, indicando que esporos devem ficar depositados nas suas estruturas, devido a configuração física que facilita o acúmulo de matéria orgânica e a formação de biofilmes, o que dificulta a remoção dos mesmos.

Apesar do *C. gasigenes* ter sido isolado em apenas uma coleta, os resultados devem ser considerados, uma vez que o microrganismo está presente no ambiente. Caso não ocorra controle adequado, pode haver a disseminação do microrganismo e a geração de graves problemas na qualidade do produto final.

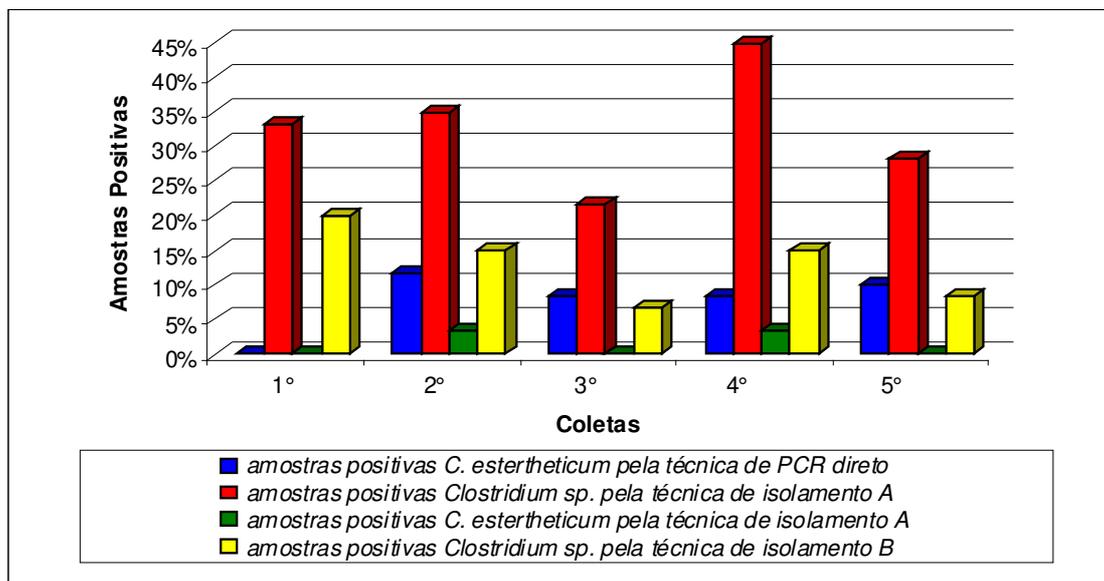


Figura 25. Distribuição de amostras positivas, pelas técnicas de detecção por PCR direta e isolamento A e B de *C. estertheticum*, em ambientes de abatedouro de bovinos e processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo, nas cinco coletas da Empresa B.

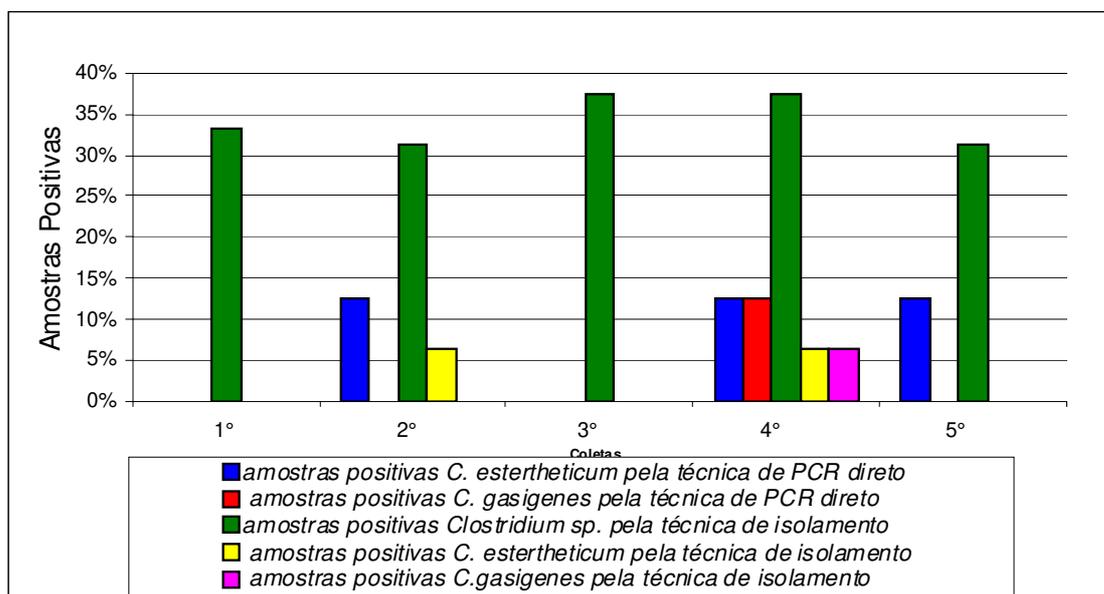


Figura 26. Distribuição da presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, pelas técnicas de detecção por PCR direta e de isolamento A, em amostras de cortes cárneos embalados a vácuo nas cinco coletas da Empresa B.

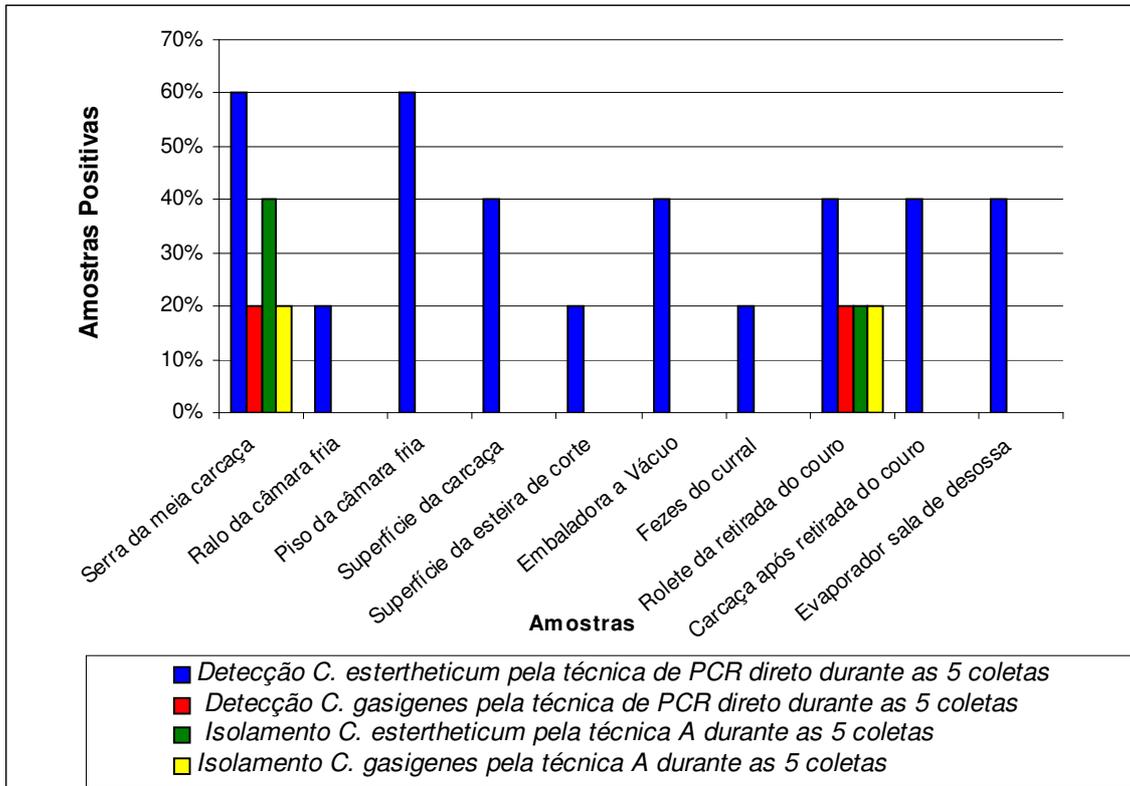


Figura 27. Distribuição da frequência de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, pelas técnicas de detecção por PCR direta e de isolamento A em amostras de ambientes da Empresa B, nas cinco coletas.

5.2.3 Comparação da detecção e isolamento de *C. estertheticum* entre as empresa A e B

Na **Figura 28** está representado o número total de amostras positivas de *C. estertheticum* obtidos pelas técnicas de PCR direta e de isolamento A. Na empresa B obteve-se o maior número (26) de amostras positivas em relação a empresa A (20), mas em relação ao isolamento, a empresa A teve um maior número de isolados (11) que a empresa B (6 isolados).

Em relação ao número de amostras positivas de *C. estertheticum* que foram detectados pela PCR direta e posteriormente também confirmados utilizando-se a técnica de isolamento A, observaram-se cinco amostras positivas em cada empresa. Também obteve-se amostras onde foram isolados o microrganismo e o mesmo não foi detectado pela técnica PCR direta, este fato pode ter ocorrido devido técnica de isolamento favorecer o desenvolvimento de células viáveis que se encontrava na forma de esporos.

Na **Figura 29** verifica-se a quantidade de isolados de *C. estertheticum* por locais no matadouro-frigorífico. Na empresa A o microrganismo foi isolado em sete amostras na sala de abate, duas na câmara fria e três no produto final, enquanto que na empresa B, o *C. estertheticum* foi isolado de três amostras da sala de abate, uma na sala de desossa e em duas amostras do produto final. Assim, observa-se que a sala de abate é um local comum nas duas Empresas e de elevado risco de contaminação, devendo-se redobrar os cuidados neste local, sendo necessário a correta higienização dos equipamentos e do local para evitar contaminação cruzada para os outros setores do matadouro-frigorífico.

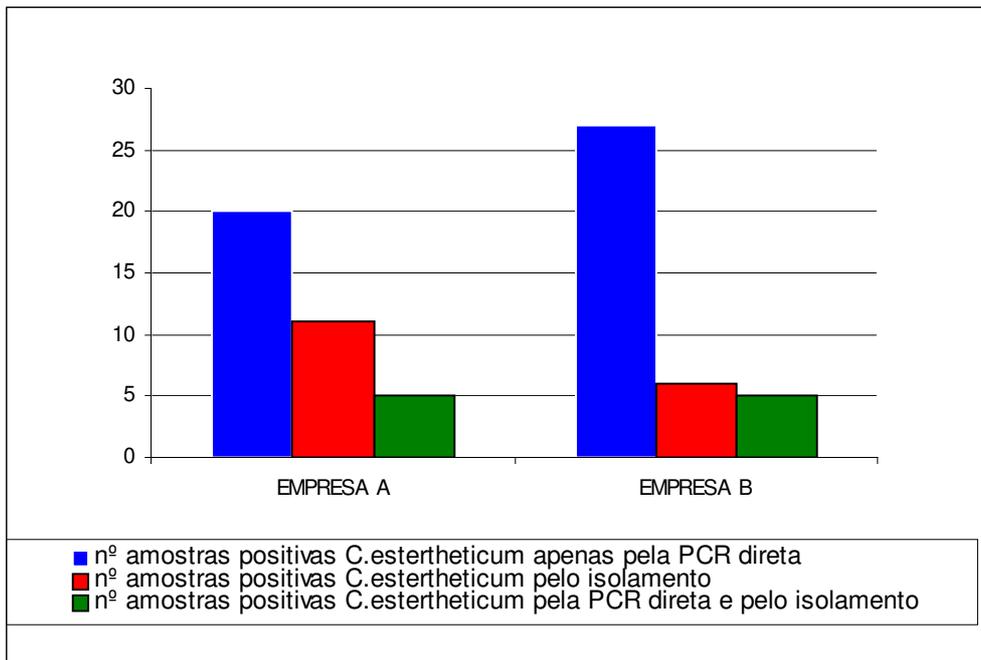


Figura 28. Distribuição de amostras positivas, pelas técnicas de detecção e isolamento de *C. estertheticum* nas Empresas A e B.

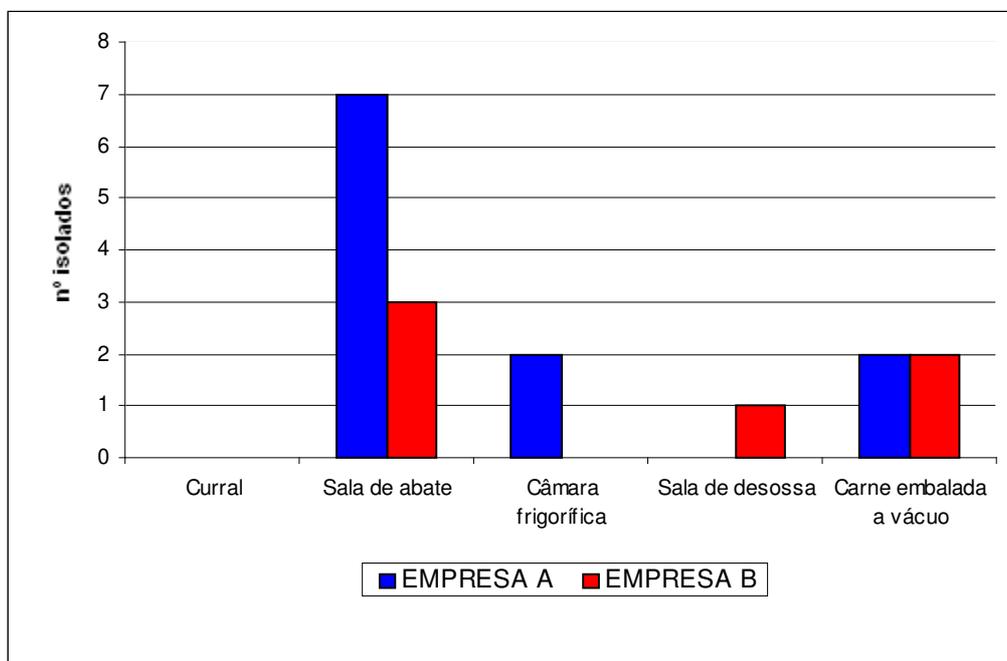


Figura 29. Quantidade de isolados de *C. estertheticum* por locais nas Empresas A e B.

5.3 Rastreamento de *C. estertheticum* e *C. gasignes* em cepas isoladas da planta de abate de bovinos e carne bovina embalada a vácuo, utilizando a técnica RFLP

Nas Figuras 30 a 33 os géis resultantes da técnica RFLP (análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do gene 16 S rDNA) utilizando as enzimas *AluI*, *HaeIII*, *HhaI* e *TaqI* podem ser observados. As endonucleases usadas produziram um bom número de bandas, facilitando a diferenciação da maioria das cepas utilizadas. A digestão dos produtos de amplificação do 16S rDNAs com *AluI* e *HhaI* dos 23 isolados permitiu diferenciar quatro grupos de PCR-RFLP, e com a endonucleases *HaeIII* e *TaqI*, foi possível diferenciar três grupos de PCR-RFLP (Tabela 24).

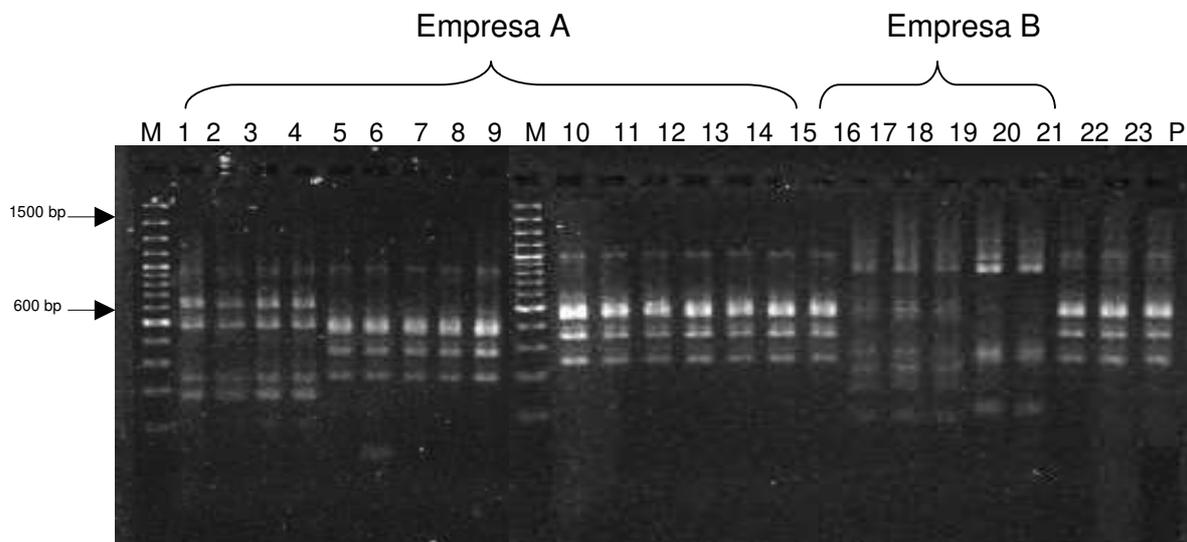


Figura 30. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima *AluI* para cepas isoladas de *C. estertheticum*. Amostras: 1: serra elétrica divisora da carcaça, 1ª coleta; 2: rolete da retirada do couro, 2ª coleta; 3: rolete da retirada do couro, 2ª coleta; 4: carcaça (após retirada do couro), 2ª coleta; 5: serra elétrica divisora da carcaça, 3ª coleta; 6: rolete da retirada do couro, 3ª coleta; 7: rolete da retirada do couro, 3ª coleta; 8: contrafilé embalado a vácuo, 3ª coleta; 9: piso da câmara fria B, 4ª coleta; 10: superfície da carcaça da câmara fria B, 4ª coleta; 11: contrafilé embalado a vácuo, 4ª coleta; 12: contrafilé embalado a vácuo, 4ª coleta; 13: serra elétrica divisora da carcaça, 5ª coleta; 14: rolete da retirada do couro, 5ª coleta; 15: rolete da retirada do couro, 5ª coleta; 16: serra elétrica divisora da carcaça, 1ª coleta; 17: embaladora a vácuo, 1ª coleta; 18: contrafilé embalado a vácuo, 1ª coleta; 19: serra elétrica divisora da carcaça, 4ª coleta; 20: rolete da retirada do couro, 4ª coleta; 21: ponta de contrafilé embalado a vácuo, 4ª coleta; 22: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca A; 23: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca D; P: cepa padrão de *C. estertheticum*.

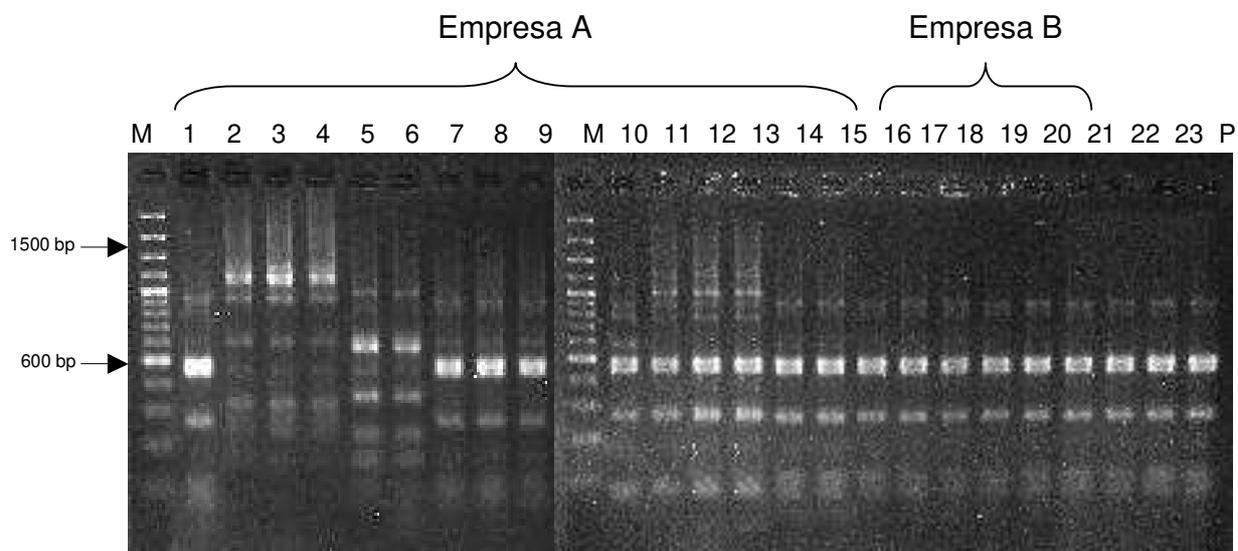


Figura 31. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima HaeIII para cepas isoladas de *C. estertheticum*. Amostras: 1: serra elétrica divisora da carcaça, 1^o coleta; 2: rolete da retirada do couro, 2^o coleta; 3: rolete da retirada do couro, 2^o coleta; 4: carcaça (após retirada do couro), 2^o coleta; 5: serra elétrica divisora da carcaça, 3^o coleta; 6: rolete da retirada do couro, 3^o coleta; 7: rolete da retirada do couro, 3^o coleta; 8: contrafilé embalado a vácuo, 3^o coleta; 9: piso da câmara fria B, 4^o coleta; 10: superfície da carcaça da câmara fria B, 4^o coleta; 11: contrafilé embalado a vácuo, 4^o coleta; 12: contrafilé embalado a vácuo, 4^o coleta; 13: serra elétrica divisora da carcaça, 5^o coleta; 14: rolete da retirada do couro, 5^o coleta; 15: rolete da retirada do couro, 5^o coleta; 16: serra elétrica divisora da carcaça, 1^o coleta; 17: embaladora a vácuo, 1^o coleta; 18: contrafilé embalado a vácuo, 1^o coleta; 19: serra elétrica divisora da carcaça, 4^o coleta; 20: rolete da retirada do couro, 4^o coleta; 21: ponta de contrafilé embalada a vácuo, 4^o coleta; 22: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca A; 23: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca D; P: cepa padrão de *C. estertheticum*.

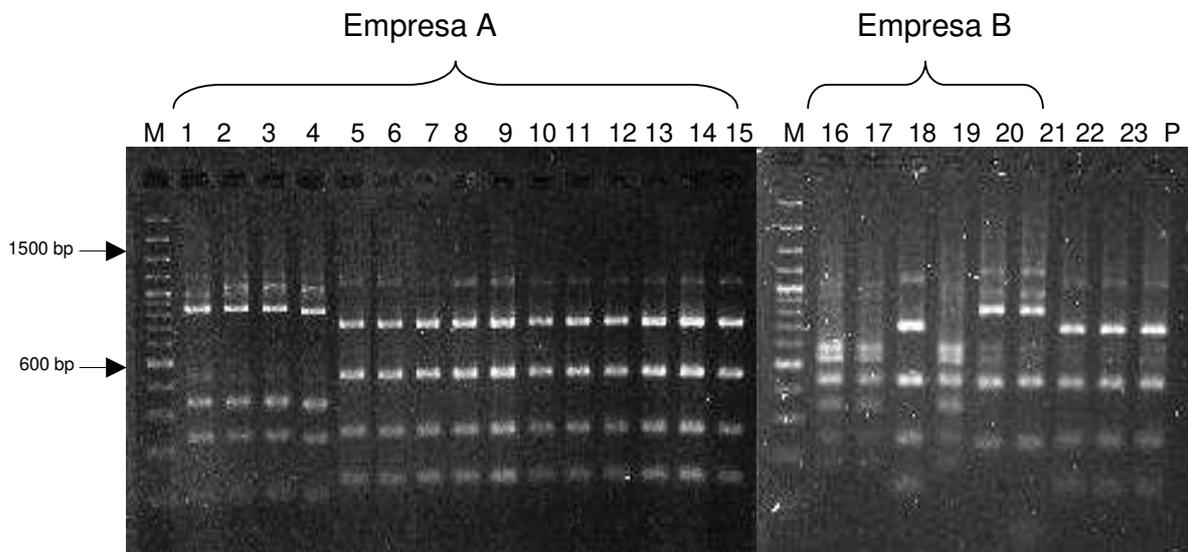


Figura 32. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima HhaI para cepas isoladas de *C. estertheticum*. Amostras: 1: serra elétrica divisora da carcaça, 1^o coleta; 2: rolete da retirada do couro, 2^o coleta; 3: rolete da retirada do couro, 2^o coleta; 4: carcaça (após retirada do couro), 2^o coleta; 5: serra elétrica divisora da carcaça, 3^o coleta; 6: rolete da retirada do couro, 3^o coleta; 7: rolete da retirada do couro, 3^o coleta; 8: contrafilé embalado a vácuo, 3^o coleta; 9: piso da câmara fria B, 4^o coleta; 10: superfície da carcaça da câmara fria B, 4^o coleta; 11: contrafilé embalado a vácuo, 4^o coleta; 12: contrafilé embalado a vácuo, 4^o coleta; 13: serra elétrica divisora da carcaça, 5^o coleta; 14: rolete da retirada do couro, 5^o coleta; 15: rolete da retirada do couro, 5^o coleta; 16: serra elétrica divisora da carcaça, 1^o coleta; 17: embaladora a vácuo, 1^o coleta; 18: contrafilé embalado a vácuo, 1^o coleta; 19: serra elétrica divisora da carcaça, 4^o coleta; 20: rolete da retirada do couro, 4^o coleta; 21: ponta de contrafilé embalada a vácuo, 4^o coleta; 22: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca A; 23: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca D; P: cepa padrão de *C. estertheticum*.

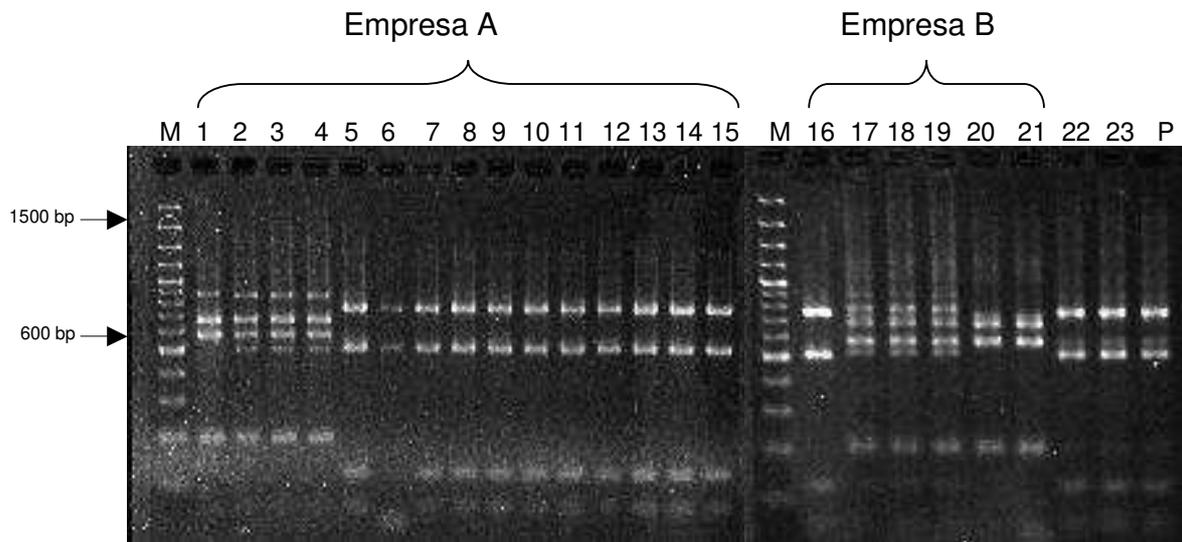


Figura 33. Gel de agarose dos produtos de restrição da enzima TaqI para cepas isoladas de *C. estertheticum*. Amostras: 1: serra elétrica divisora da carcaça, 1^o coleta; 2: rolete da retirada do couro, 2^o coleta; 3: rolete da retirada do couro, 2^o coleta; 4: carcaça (após retirada do couro), 2^o coleta; 5: serra elétrica divisora da carcaça, 3^o coleta; 6: rolete da retirada do couro, 3^o coleta; 7: rolete da retirada do couro, 3^o coleta; 8: contrafilé embalado a vácuo, 3^o coleta; 9: piso da câmara fria B, 4^o coleta; 10: superfície da carcaça da câmara fria B, 4^o coleta; 11: contrafilé embalado a vácuo, 4^o coleta; 12: contrafilé embalado a vácuo, 4^o coleta; 13: serra elétrica divisora da carcaça, 5^o coleta; 14: rolete da retirada do couro, 5^o coleta; 15: rolete da retirada do couro, 5^o coleta; 16: serra elétrica divisora da carcaça, 1^o coleta; 17: embaladora a vácuo, 1^o coleta; 18: contrafilé embalado a vácuo, 1^o coleta; 19: serra elétrica divisora da carcaça, 4^o coleta; 20: rolete da retirada do couro, 4^o coleta; 21: ponta de contrafilé embalada a vácuo, 4^o coleta; 22: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca A; 23: contrafilé embalado a vácuo comercial – marca D; P: cepa padrão de *C. estertheticum*.

Tabela 23. Grupos de *C. esterteheticum* obtidos pela técnica RFLP

| Cepa | Grupos PCR-RFLP obtidos durante digestão do gene 16S rDNA com | | | | Genótipo PCR-RFLP |
|------|---|---------|-------|-------|-------------------|
| | Alu I | Hae III | Hha I | Taq I | |
| 1 | a | e | h | i | A |
| 2 | a | f | h | i | B |
| 3 | a | f | h | i | B |
| 4 | a | f | h | i | B |
| 5 | b | g | i | m | C |
| 6 | b | g | i | m | C |
| 7 | b | e | i | m | D |
| 8 | b | e | i | m | D |
| 9 | b | e | i | m | D |
| 10 | b | e | i | m | D |
| 11 | b | e | i | m | D |
| 12 | b | e | i | m | D |
| 13 | b | e | i | m | D |
| 14 | b | e | i | m | D |
| 15 | b | e | i | m | D |
| 16 | b | e | j | m | E |
| 17 | c | e | j | n | F |
| 18 | c | e | i | n | G |
| 19 | c | e | j | n | F |
| 20 | d | e | k | o | H |
| 21 | d | e | k | o | H |
| 22 | b | e | i | m | D |
| 23 | b | e | i | m | D |
| 24 | b | e | i | m | D |

Utilizando as quatro enzimas, foi possível observar oito genótipos distintos nos isolados de amostras ambientais e amostras de carne embalada a vácuo coletada nas duas empresas (**Tabela 23**). Broda et al. (2000) também observaram oito grupos PCR-RFLP distintos fazendo a digestão da PCR do gene 16S rDNA com as mesmas enzimas (*AluI*, *HaeIII*, *HhaI* e *TaqI*), em um total de 22 cepas de clostrídios psicotróficos e psicofílicos isolados de carnes.

Na empresa A, podem-se observar quatro grupos de genótipo PCR-RFLP, sendo isolado o perfil A apenas na primeira coleta e o perfil B apenas na segunda. Quando se comparam esses dois perfis com a digestão da PCR do gene 16S

rDNA com as enzimas *AluI*, *HhaI* e *TaqI*, verifica-se similaridade entre eles; ou seja, se a digestão fosse realizada com apenas essas três enzimas, os isolados apresentariam o mesmo perfil. Na terceira coleta, foram encontrados dois perfis (C e D) que, quando comparados à digestão da PCR do gene 16S rDNA com as enzimas *AluI*, *HhaI* e *TaqI*, também apresentam igualdade nas bandas obtidas pela técnica PCR-RFLP. Nas quarta e quinta coletas, foi identificado apenas um perfil (D) nos isolados (**Tabela 24**).

O isolado nº. 1, originário da serra elétrica que divide a carcaça, da primeira coleta realizada na Empresa A, apresentou perfil diferente dos outros isolados, sendo caracterizada como genótipo PCR-RFLP A. Os isolados do rolete da retirada do couro e da carcaça (após a retirada do couro) provenientes da segunda coleta da empresa A apresentaram perfil B.

Na terceira coleta da Empresa A, o isolado da serra elétrica divisora da carcaça apresentou perfil C e os isolados do rolete de retirada do couro apresentaram os perfis C e D (**Tabela 24**). Comparando-se a digestão da PCR do gene 16S rDNA com as enzimas *AluI*, *HhaI* e *TaqI*, pode-se dizer que as bandas são idênticas ao grupo PCR-RFLP D.

Na empresa A o perfil D foi predominante, sendo isoladas em diferentes amostras e em três ocasiões, indicando uma provável resistência e adaptação as condições adversas do ambiente do abatedouro. Este perfil foi observado em nove isolados (Tabela 24), os quais foram provenientes do rolete de retirada do couro e do contrafilé embalado a vácuo, na terceira coleta; piso da câmara fria B, superfície da carcaça da câmara fria B e contrafilé embalado a vácuo, na quarta coleta; serra divisora da carcaça e rolete de retirada do couro, na quinta coleta (**Tabela 24**).

Tabela 24. Perfis da PCR-RFLP do gene 16S rDNA de *C.estertheticum* encontrados na empresa A.

| Empresa | Coleta | Amostra | Genótipo |
|---------|----------------|--|----------|
| A | 1 ^a | serra elétrica divisora da carcaça | A |
| | 2 ^a | rolete da retirada do couro | B |
| | 2 ^a | carcaça (após retirada do couro) | B |
| | 3 ^a | serra elétrica divisora da carcaça | C |
| | 3 ^a | rolete de retirada do couro | C e D |
| | 3 ^a | contrafilé embalado a vácuo | D |
| | 4 ^a | piso da câmara fria B | D |
| | 4 ^a | superfície da carcaça da câmara fria B | D |
| | 4 ^a | contrafilé embalado a vácuo | D |
| | 5 ^a | serra elétrica divisora da carcaça | D |
| | 5 ^a | rolete de retirada do couro | D |
| B | 1 ^a | serra elétrica divisora da carcaça | E |
| | 1 ^a | Embaladora a vácuo | F |
| | 1 ^a | contrafilé embalado a vácuo | G |
| | 4 ^a | serra elétrica divisora da carcaça | F |
| | 4 ^a | rolete de retirada do couro | H |
| | 4 ^a | ponta de contrafilé embalado a vácuo | H |

Pelos resultados (**Tabela 24**) na Empresa A, o mesmo perfil (B) foi encontrado em isolados de rolete da retirada do couro e na carcaça bovina após retirada do couro durante a segunda coleta. O perfil D foi isolado do rolete e da carne (contrafilé embalado a vácuo) na terceira coleta, sugerindo uma possível contribuição do rolete como fonte potencial de contaminação da carne. Dessa

forma, supõe-se que a contaminação presente no equipamento da sala de abate está passando pelas várias etapas do processo até o produto final. Isso também pode ser observado na quinta coleta, onde o isolado da carne embalada a vácuo tem o mesmo perfil (D) dos isolados no piso e na superfície da carcaça da câmara fria. Assim o programa de higienização e o plano APPCC da empresa não estão impedindo que a contaminação, chegue até o produto final.

O isolado número 16, isolada da serra elétrica divisora da carcaça, da primeira coleta realizada na Empresa B, possui perfil PCR-RFLP E. Ao ser comparado esse perfil à digestão da PCR do gene 16S rDNA com as enzimas *AluI*, *HheIII* e *HhaI*, pode-se dizer que as bandas são idênticas ao grupos PCR-RFLP D (**Tabela 25**).

No grupo de genótipo PCR- RFLP F, encontram-se as cepas isoladas da embaladora a vácuo e da serra divisora da carcaça, respectivamente, da primeira e quarta coletas realizadas na Empresa B. Verificando-se apenas a digestão da PCR do gene 16S rDNA com as enzimas *AluI*, *HheIII* e *TaqI*, pode-se dizer que as bandas são iguais ao grupo PCR-RFLP G, o qual é constituído apenas por uma cepa isolada de carne bovina embalada a vácuo (contrafilé), da quarta coleta na Empresa B (**Tabela 25**).

Os isolados de números 20 e 21, do rolete de retirada do couro e do contrafilé embalado a vácuo, da quarta coleta na Empresa B, apresentaram o perfil PCR-RFLP H, não havendo similaridade com as demais cepas isoladas nesse estabelecimento.

Na Empresa B, observam-se quatro perfis de genótipo PCR- RFLP diferentes da Empresa A (**Tabela 24 e 25**). Nesta empresa A, obtiveram-se diferentes perfis de genótipo PCR- RFLP em uma mesma coleta; sendo isolados, na primeira coleta, cepas com perfis E, F e G e, na quarta coleta, cepas com perfis F e H.

Na Empresa B, verifica-se que o isolado da amostra de contrafilé embalado a vácuo, da primeira coleta, não possui o mesmo perfil (G) do isolado da serra elétrica divisora da carcaça (E) e da embaladora a vácuo (F). Na quarta coleta, verifica-se que o isolado da amostra de carne embalada a vácuo (ponta de contrafilé) possui o mesmo perfil da cepa isolada da amostra do rolete de retirada do couro (**Tabela 24**), fato este também observado na empresa A.

Os isolados 22 e 23, de contrafilé embalado a vácuo (adquiridos no comércio de Campinas – SP; marcas A e D, respectivamente), apresentam perfil D, que é o mesmo da cepa padrão de *C. estertheticum* DSM 8809.

Os resultados, presentes neste estudo, mostram que a técnica PCR-RFLP permite a diferenciação genotípica de *C. estertheticum*. Porém, para a obtenção de resultados mais discriminatórios seriam necessários análises adicionais, como seqüenciamento do gene 16S rDNA.

Na **Figura 34**, podem-se observar o gel resultante da técnica PCR-RFLP (análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição) da digestão da PCR do gene 16S rDNA com as enzimas *AluI*, *HaeIII*, *HhaI* e *TaqI*, para as culturas de *C. gasigenes* isoladas neste trabalho. Pela técnica utilizada, não foi possível observar diferenças genéticas nos cinco isolados analisados (**Tabela 25**). Como o microrganismo foi isolado somente na quarta coleta da empresa B, verifica-se que os isolados da amostra de carne embalada a vácuo possuem o mesmo perfil do isolado da serra elétrica divisora da carcaça e do rolete de retirada do couro, assim, supõe-se que a contaminação presente nos equipamentos da sala de abate atingiu o produto final, da mesma forma ocorrida com o *C. estertheticum*. Melhorias nos procedimentos de higienização, especialmente da serra elétrica divisora da carcaça e do rolete de retirada do couro, devem ser realizados pelas empresas para obtenção de uma boa qualidade do produto final.

No Brasil, dados de pesquisas referentes a estes microrganismos ainda não havia sido objeto de nenhuma publicação de níveis nacional e internacional. Pelo fato de os microrganismos citados serem anaeróbios estritos (além de serem

psicrofílicos e psicrotróficos), há muitas dificuldades e obstáculos no seu cultivo e isolamento.

Para o país, o isolamento destes microrganismos é de extrema relevância, pois a partir de cepas isoladas, originárias das fontes de contaminação, as pesquisas direcionadas ao conhecimento das características e do comportamento dos microrganismos poderão ser ampliados visando o seu controle ao longo da cadeia produtiva.

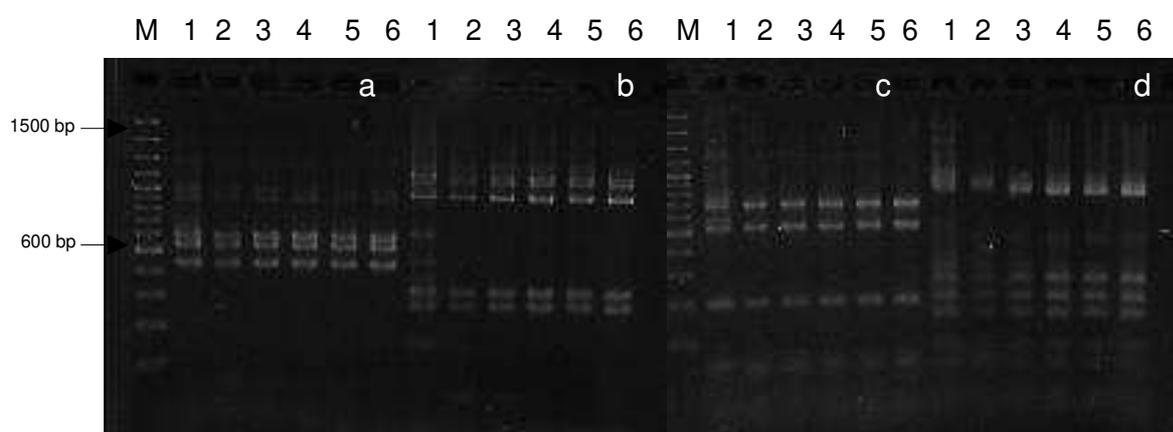


Figura 34. Gel de agarose dos produtos de restrição das enzimas HhaI (a), HaeIII (b), TaqI (c) e AluI (d) para cepas isoladas de *C. gasigenes*. Amostras: 1: rolete de retirada do couro, 4º coleta – Empresa B; 2: rolete de retirada do couro, 4º coleta – Empresa B; 3: serra elétrica divisora da carcaça, 4º coleta – Empresa B; 4: serra elétrica divisora da carcaça, 4º coleta – Empresa B; 5: filé-mignon embalado a vácuo, 4º coleta – Empresa B; 6: controle cepa padrão de *C. gasigenes*

Tabela 25. Grupos de *C. gasigenes* obtidos pela técnica RFLP

| Cepa | Grupos PCR-RFLP obtidos pela digestão do gene 16S rDNA | | | | Genótipo PCR-RFLP |
|------|--|---------|-------|-------|-------------------|
| | Alu I | Hae III | Hha I | Taq I | |
| 1 | a | b | c | d | A |
| 2 | a | b | c | d | A |
| 3 | a | b | c | d | A |
| 4 | a | b | c | d | A |
| 5 | a | b | c | d | A |
| 6 | a | b | c | d | A |

5.4 Ocorrência e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em carnes resfriadas embaladas a vácuo obtidas do comércio

Na **Tabela 26**, está apresentada a síntese das análises realizadas em um total de 60 amostras comerciais de carne bovina resfriada e embalada a vácuo de quatro marcas diferentes. Os resultados obtidos, utilizando-se a técnica PCR para detecção direta de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, mostram uma incidência de 10% (6/60) de *C. estertheticum* na carne bovina embalada a vácuo sob refrigeração, não sendo detectado *C. gasigenes*. **Tabela 26.** Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de carne bovina resfriada embalada a vácuo adquiridas no comércio de Campinas-SP.

A marca A apresentou o maior índice: 20% (3/15) de amostras positivas, seguido pelas marcas B, com 13,33% (2/15) de amostras positivas e D, com 6,66% (1/15). A marca C não apresentou nenhuma amostra positiva.

Tabela 26. Detecção e isolamento de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em amostras de carne bovina resfriada embalada a vácuo adquiridas no comércio de Campinas-SP.

| Identificação da amostra | | | Nº de amostras positivas | | | | |
|--------------------------|---------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Marca | Amostra | Nº amostras | PCR | | Isolamento C | | |
| | | | <i>C.e</i> | <i>C.g.</i> | <i>C.</i> | <i>C. e.</i> | <i>C. g.</i> |
| A | Contrafilé | 5 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| A | Alcatra | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| A | Ponta de contrafilé | 5 | 2 | 0 | 3 | 1 | 0 |
| B | Contrafilé | 5 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| B | Alcatra | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B | Ponta de contrafilé | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| C | Contrafilé | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| C | Alcatra | 5 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| C | Ponta de contrafilé | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| D | Contrafilé | 5 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| D | Alcatra | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| D | Ponta de contrafilé | 5 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |

C.=*Clostridium* sp.; *C.e.* = *Clostridium estertheticum*; *C.g.* = *Clostridium gasigenes*; PCR = utilização da técnica PCR direta, sem enriquecimento da amostra; Isolamento = utilização de 2 mL amostra, sem choque térmico e enriquecimento em PYGS com carne (Figura 12)

Dessa forma, pode-se constatar que o *C. estertheticum* está presente em amostras comerciais de carne bovina embalada a vácuo de diferentes marcas e regiões do Brasil (sudeste e centro-oeste). Esta contaminação, provavelmente originária da planta industrial, constitui uma fonte em potencial, conforme relatado por Broda et al. (2002) e Rauecker (2007), em ambientes de matadouros-frigoríficos. Além disso, a condição de anaerobiose (criada no interior do produto e nas condições de embalagem) e a temperatura de armazenamento e comercialização a que são submetidos, inferior a 7°C, são favoráveis à germinação dos esporos e multiplicação de *C. estertheticum*.

Dentre os tipos de corte, o único que apresentou contaminação pelo microrganismo foi o contrafilé que, por estar localizado na parte externa da carcaça, fica sujeito a uma maior exposição ao ar atmosférico presente nas instalações do matadouro-frigorífico e ao contato direto com manipuladores e superfícies de equipamentos.

A presença de *C. estertheticum*, nestas amostras, pode ter sido favorecida pelas condições de armazenagem da carne embalada a vácuo e sob refrigeração, uma vez que esse microrganismo é anaeróbio estrito e psicrotrófico, apresentando temperatura ótima para crescimento a 6 - 8°C, com limite a 13°C.

Mesquita et al. (2006) verificaram a presença de *C. estertheticum*, pela técnica de PCR direta, em 14% das amostras de um total de 193 cortes cárneos bovinos embalados a vácuo, obtidos em matadouros-frigoríficos localizados em Goiás, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Pará, Minas Gerais e Bahia.

OLIVEIRA (2007) verificou a presença de *C. estertheticum* em leite e queijo (parmesão e provolone) em 127 amostras, sendo 28 (22,0%) positivas: 11 amostras (34,4%) em 32 de leite cru e 17 amostras (17,9%) em 95 de queijo (parmesão e provolone).

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada presença de *C. gasigenes* pela técnica de PCR direta e pelo método de isolamento. Raucker et al (2006) também não detectaram a presença de *C. gasigenes* em 193 amostras de carne bovina embalada a vácuo de diferentes matadouros-frigoríficos, através da técnica da PCR.

Neste trabalho, as amostras foram analisadas após 30 dias de fabricação, não apresentando sinais de deterioração, mesmo quando positivas para *C. estertheticum*.

Através do enriquecimento da amostra em PYGS, a 4°C, durante 21 dias e posterior incubação em CBA com sangue, a 10°C, por mais 21 dias, foi possível o isolamento de *Clostridium* sp. psicrotolerantes em 33,33% (20/60) amostras, destacando-se que em 3,33% (2/60) também foram isolados *C. estertheticum* (contrafilé da marca D e ponta de contrafilé da marca A). Nessas duas amostras, a detecção direta por PCR, através do líquido exsudado, também foi positiva.

Nas amostras positivas para *Clostridium* sp. e não para *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, poderiam estar envolvidos clostrídios psicrotolerantes, como: *C. algidicarnis*, que foi isolado de carne suína cozida embalada a vácuo, causando alteração no odor do produto (LAWSON et al., 1994); *C. frigidicarnis*, também já isolado de carne bovina embalada a vácuo, apresentando deterioração “blown-pack” em abuso de temperatura e *C. algidixylanolyticum*, isolado de carne de carneiro embalada a vácuo. (BRODA et al., 2000). Outros microrganismos suspeitos poderiam ser o *C. botulinum* tipo E e as cepas não proteolíticas dos tipos B e F, pois conseguem sobreviver em baixas temperaturas, com mínimo de 3,3°C, não causando deteriorações graves - devido à ausência de enzimas proteolíticas (PHILIPS, 1996).

Assim, tem-se que os resultados obtidos merecem atenção, pois independentemente do número de amostras positivas, a presença do microrganismo no produto final - em diferentes indústrias - indica que não está havendo controle apropriado em relação à sua disseminação. O microrganismo

está chegando ao produto final, podendo desenvolver-se devido às condições de anaerobiose e de temperatura apropriada, provocando deterioração “blown-pack” e ocasionado graves problemas econômicos; além de forte impacto negativo para os matadouros-frigoríficos brasileiros.

5.5 Análise da composição de gases em amostras estufadas

O dióxido de carbono apresentou concentração majoritária na composição gasosa das amostras, sendo a maior concentração encontrada na amostra comercial (53,87%), seguido da amostra inoculada com *C. estertheticum* (25,28%) e da amostra inoculada com *C.gasigenes* (7,04%). A presença de oxigênio foi inferior a 1,5% e a de nitrogênio foi inferior a 1%, em todas as amostras. Na amostra comercial constatou-se a presença de mercaptana (**Tabela 27**).

O dióxido de carbono pode ser considerado o gás primário responsável pela distensão da embalagem; enquanto que o metil mercaptana e os hidrocarbonetos, os componentes que originaram odores desagradáveis aos produtos. Dainty et al (1989) também detectaram o dióxido de carbono como gás dominante em carnes comerciais com deterioração “blown-pack”.

Tabela 27: Composição quantitativa de alguns componentes da composição gasosa em embalagens estufadas de carne bovina embalada a vácuo.

| Componentes | Carne comercial estufada com detecção de <i>C. estertheticum</i> | Carne estufada inoculada com <i>C. estertheticum</i> | Carne estufada inoculada com <i>C. gasigenes</i> |
|--------------------|--|--|--|
| Dióxido de carbono | 53,87% | 25,28% | 15,12% |
| Nitrogênio | < 1% | < 1% | < 1% |
| Oxigênio | 1,2% | 1,1% | 1,4% |
| Mercaptana* | + | - | - |

* análise qualitativa

5.6 Atividade de diferentes sanitizantes sobre os esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

5.6.1 Produção e contagem de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

A produção de esporos foi realizada nos três meios testados RCM, PYGS e meio de carne contendo carne cozida após 6 meses de incubação a 15°C para *C. gasigenes* e 8 meses de incubação a 10°C para *C. estertheticum*.

Os melhores resultados para contagem de esporos foram obtidos através da metodologia que consistia na diluição em tampão fosfato e posterior choque térmico a 80°C por 10 minutos, plaqueamento em CBA e incubação a 10°C (metodologia F) e 15°C (Metodologia J) por três semanas, respectivamente para *C. estertheticum* e *C. gasigenes* (**Tabela 28**). Broda et al. (2007) também utilizaram CBA e incubação a 10°C para contagem de *C. estertheticum*.

Tabela 28. Médias e desvio padrão dos resultados de contagens de esporos para *C. estertheticum* e *C. gasigenes* obtidos com diferentes metodologias.

| Microrganismo | Metodologia de contagem | log UFC/mL (desvio padrão) |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| <i>C. gasigenes</i> | a | n.c. |
| | b | n.c. |
| | c | n.c. |
| | d | n.c. |
| | e | n.c. |
| | f | 8,52 (0,3) |
| | g | 5,43 (0,5) |
| | h | 2,26 (0,5) |
| <i>C. estertheticum</i> | i | n.c. |
| | j | 7,85 (0,4) |
| | k | 5,24 (0,3) |
| | l | 3,28 (0,3) |
| | m | 6,34 (0,2) |

n.c.: não foi observado crescimento.

5.6.2 Teste esporicida

Nas **Tabelas 29 e 30** são apresentados as médias do fator de inativação sobre esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* submetidos a diferentes sanitizantes. Pelo teste da União Europeia prEN14347 o sanitizante é considerado esporicida quando apresenta um fator de inativação (FI) de no mínimo 4,0 log UFC/mL.

Tabela 29. Médias e desvio padrão do fator de inativação (log de UFC/mL) de esporos de *C. estertheticum* em diferentes sanitizantes.

| Tempo de exposição (min) | Fator de inativação dos sanitizantes | | | |
|--------------------------|--------------------------------------|-----------|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5 | 2,1 (0,5) | 3,1 (0,3) | >7,82 | 4,51 (0,3) |
| 15 | 6,2 (0,4) | >7,82 | >7,82 | >7,82 |
| 30 | >7,82 | >7,82 | >7,82 | >7,82 |

1: sanitizante a base de Hipoclorito de sódio 100 mg/L (pH 10,8)

2: sanitizante a base de Ácido peracético 100 mg/L (pH 2,9)

3: sanitizante a base de Ácido peracético 500 mg/L (pH 2,4)

4: sanitizante a base de Peróxido de hidrogênio 200 mg/L (pH 1,3)

Tabela 30. Médias e desvio padrão do fator de inativação (log de UFC/mL) de esporos de *C. gasigenes* em diferentes sanitizantes.

| Tempo de exposição (min) | Fator de inativação dos sanitizantes | | | |
|--------------------------|--------------------------------------|-----------|--------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5 | 2,83 (0,4) | 3,6 (0,3) | > 8,77 | 4,6 (0,4) |
| 15 | 7,57 (0,4) | > 8,77 | > 8,77 | > 8,77 |
| 30 | > 8,77 | > 8,77 | > 8,77 | > 8,77 |

1: sanitizante a base de Hipoclorito de sódio 100 mg/L (pH 10,8)

2: sanitizante a base de Ácido peracético 100 mg/L (pH 2,9)

3: sanitizante a base de Ácido peracético 500 mg/L (pH 2,4)

4: sanitizante a base de Peróxido de hidrogênio 200 mg/L (pH 1,3)

O sanitizante a base de hipoclorito de sódio a 100 mg/L (Divosan Hypochlorite) teve efeito esporicida para *C. estertheticum* a partir de 15 minutos de contato com FI de 6,2 log UFC/ml. Para o *C. gasigenes* também foi observado o efeito esporicida do hipoclorito de sódio a partir de 15 minutos de contato com FI de 7,57 log UFC/mL. Andrade e Serrano (1993), utilizaram 105 mg/L de cloro

residual, a partir do hipoclorito de sódio, em pH 8,0 a 30°C e obtiveram 5 reduções logarítmicas na população dos esporos de *Bacillus subtilis* em 5 minutos de contato pelo método de suspensão.

Em relação ao efeito esporicida do ácido peracético a 100 mg/L (Divosan Forte) encontrou-se um efeito esporicida a partir de 15 minutos de contato com esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* com fatores de inativação superior a 7,82 e 8,77 log UFC/mL, respectivamente. Já com ácido peracético a 500 mg/L observou-se o efeito esporicida a partir de 5 minutos de contato com esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, ambos com fator de inativação superior a 7,0 log UFC/mL. Broda et al. (2007) também verificaram o efeito esporicida do ácido peracético a 180 mg/L em *C. estertheticum* e observaram redução de 4 a 5 log UFC/mL após 5 minutos de exposição. Wullt et al., 2003 também utilizaram o método da União Europeia prEN14347 e verificaram uma redução superior a 4 log UFC/mL na ação do ácido peracético em 5 minutos de contato com esporos de *Clostridium difficile*.

Utilizando o sanitizante a base de peróxido de hidrogênio a 200 mg/L foi observado efeito esporicida para *C. estertheticum* e o *C. gasigenes* a partir de 5 minutos de contato com FI de 4,51 e 4,60 log de UFC/ml, respectivamente.

Os sanitizantes que tiveram melhor eficiência foram a base de peróxido de nitrogênio 200 mg/L e ácido peracético 500 ppm pois apresentaram um FI maior que 4 log UFC/ml para 5 minutos de exposição. Este fato pode ser atribuído ao peróxido de hidrogênio, que também está presente no ácido peracético, ser considerado forte oxidante, devido à sua capacidade de produzir radicais livres que atacam componentes celulares essenciais, incluindo proteínas, lípidios e DNA (YUAN et al., 1997; ZHAO et al., 2007)

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir:

- As fontes de disseminação de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* na linha de processamento de carne bovina embalada a vácuo podem ser originárias de diversos locais como equipamentos, carcaças e nos ambientes de frigoríficos exportadores.
- *C. estertheticum* ocorrem tanto em cortes de carne bovina embalada a vácuo, tipo exportação como em produtos para o consumo no país.
- *C. gasigenes* ocorrem em amostras de carnes embaladas a vácuo, tipo exportação.
- A presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, em amostras de equipamentos, carcaças e nos ambientes de matadouros frigoríficos exportadores de carne bovina embalada a vácuo, revelam o elevado grau de contaminação cruzada ao qual a carne está exposta ao longo do processamento, afetando a qualidade e a vida útil do produto final.
- A presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em equipamentos, cuja configuração física propicia maior acúmulo de resíduos, como o rolete utilizado para retirar o couro, a serra elétrica que divide as carcaças e evaporadores de câmaras frias, revela a importância da necessidade de elaboração de procedimentos de higiene operacional padronizados específicos para os processos de higienização destes equipamentos.

- Tanto a técnica PCR direta como o isolamento podem representar uma ferramenta importante para o diagnóstico da contaminação microbiana por *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.
- A utilização da técnica PCR-RFLP, foi uma excelente ferramenta para avaliação da contaminação cruzada de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* entre as diversas etapas de processamento e produto final.
- Os sanitizantes a base de ácido peracético a 500 mg/L e peróxido de hidrogênio a 200 mg/L apresentaram melhor ação esporicida para *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, quando comparado ao hipoclorito de sódio 200 mg/L por 15 min.
- As empresas frigoríficas de abates de bovinos e processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo, tanto para o mercado externo quanto para o interno, necessitam da implantação de programas de higienização padronizados e eficientes, para o controle de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* nas unidades processadoras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. N.; CHATTOPADHYAY, U. K.; SHERIKAR, A. T.; WASKAR, V. S.; PATURKAR, A. M.; LATHA, C.; MUNDE, K. D.; PATHARE, N. S. Chemical sprays as a method for the improvement in microbiological quality and shelf-life of fresh sheep and goat meats during refrigeration storage (5 . 7 °C), **Journal of Meat Science**, v.63, p.339-344, 2002.

ALASRI, A.; ROQUES, C.; MICHEL, G. Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal Microbiological**, v.38, p. 635-41, 1992.

ALVARENGA, M. B.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P. Ação de formulados comerciais à base de cloro, iodo, ácido peracético ou peróxido de hidrogênio sobre esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 19659. In: **SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA NA UFV**, 2º, Viçosa, Imprensa Universitária. UFV, p. 170-171, 1991.

ANDRADE, N. J., SERRANO, A. M. Use of *Bacillus subtilis* spores to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite at different concentration and pH values. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, n.1, p.26-31, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC) – **Exportações e importações de carne bovina “in natura” e industrializada**. In: www.abiec.com.br acessado em 30/08/2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Preparo da amostra para exame microbiológico**. Rio de Janeiro: ABNT, 1988

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K (Ed.). **Short protocols in molecular biology**, New York: John Wiley & Sons, 1999.

AVERY,S.M.; LIEBANA, E.; HUTCHISON,M.L.; BUNCIC,S. Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans. **International Journal of Food Microbiology**; v.92, n.2, p.161-169, 2004.

BACON, R.T.; BELK, K.E.; SOFOS, J.N.; CLAYTON, R.P.; REAGAN, J.O.; SMITH, G.C. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p. 1.080-1.086, 2000.

BAILEY,G.; VANSELOW, B.; HORNITZKY,M.; HUM S.; EAMENS,G.; GILL,P.; WALKER, K; CRONIN, J. A study of the foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria* and *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia, **CDI** , v.27, n. 2, p.249-257, 2003.

BEACH, J. C.; MURANO, E. A.; ACUFF, G. R Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1687-1693, 2002a.

BEACH, J. C.; MURANO, E. A.; ACUFF, G. R. Serotyping and Antibiotic Resistance Profiling of *Salmonella* in Feedlot and Nonfeedlot Beef Cattle. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.11, p.1694-1699, 2002b.

BELL, R. G. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 292-300, 1997.

BELL, R.G.; MOORHEAD, S.M.; BRODA, D.M. Influence of heat shrink treatments on the onset of clostridial “blow pack” spoilage of vacuum packed chilled meat.

Food research international, n.34, p.271-275, 2001.

BLOCK, S.S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea Febiger, Chap.9, p.167-181. 1991.

BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; PENNEY, N.; BRIGHTWELL, G. Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of “blown pack” spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. **Journal of Food Protection**, v.70, n.6, p. 1434–1439, 2007.

BOEREMA, J.A.; BRODA, D.M.; BELL, R.G. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.406-411, 2003.

BOEREMA, J.A.; BRODA, D.M.; BELL, R.G. PCR detection of psychrotolerant clostridia associated with deep tissue spoilage of vacuum-packed chilled meats. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.446-450, 2002.

BOWMAN, J.P.; REA, S.M.; MCCAMMON, S.A.; MCMEEKIN, T.A. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica.

Environmental Microbiology, v.18, n.2, p.227–237, 2000.

BRAMBILLA, E.; HIPPE, H.; HAGELSTEIN, A.; TINDALL, B. J.; STACKEBRANDT, E. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Extremophiles**, v.5, p.23–33, 2001.

BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; URLICH, S.; BOEREMA, J. Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. **International Journal of Food Microbiology** v.119, p. 334–339, 2007.

BRIGHTWELL, G.; BOEREMA, J.; MILLS, J.; MOWAT, E.; PULFORD, D. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. **International journal of food microbiology**, v. 109, n.1-2, p. 47-53, 2006

BRODA, D. M.; LACY, K. M.; BELL, R. G. Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.69-78, 1998.

BRODA, D. M.; LACY, K. M.; COOK, R. L.; BELL, R. G. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.40, p. 93-98, 1997.

BRODA, D. M.; LAWSON, P. A.; BELL, R. G.; MUSGRAVE, D. R. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with “blown pack” spoilage of vacuum-packed meats. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p.1539-1550, 1999.

BRODA, D. M.; MUSGRAVE, D. R.; BELL, R. G. Molecular differentiation of clostridia associated with ‘blown pack’ spoilage of vacuum-packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, n.1, p.71-77, 2003b.

BRODA, D. M.; SAUL, D. J.; LAWSON, P. A.; BELL, R. G.; MUSGRAVE, D. R. *Clostridium gasigenes* sp. nov. a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p. 107-118, 2000.

BRODA, D. M.; MUSGRAVE, D. R.; BELL, R. G. Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats, **Journal of Applied microbiology**, v.88, p.107-116, 2002b.

BRODA, D.M.; BELL, R.G.; BOEREMA, J.A.; MUSGRAVE, D.R. The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. Causing "blow pack" spoilage of vacuum-packed chilled venison. **Journal of Applied microbiology**, v.93, p.817-824, 2002.

BRODA, D.M.; BOEREMA, J.A.; BELL, R.G. PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.515-522, 2003.

BRODA, D.M.; De LACY, K.M.; BELL, R.G.; BRAGGINS, T.J. COOK, R.L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with "blown pack" spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.335-352. 1996a.

BRODA, D.M.; De LACY, K.M.; BELL, R.G.; PENNY N. association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb. **International Journal of food Microbiology**, v.29, p.371-378. 1996b.

BRODA, D.M.; SAUL, D. J.; BELL, R. G.; MUSGRAVE, D. R. *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.50, p. 623–631, 2000.

BRODA, D.M.; The effect of peroxyacetic acid-based sanitizer, heat and ultrasonic waves on the survival of *Clostridium estertheticum* spores in vitro, **Letters in Applied Microbiology**, v.45, n.3, p. 336-341, 2007.

BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Animal welfare: concept and related issues – Review. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

BROWN, C. A.; HARMON, B. G.; ZHOA, T.; DOYLE, M. P. Experimental *Escherichia coli* 0157:H7 carriage in calves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.27-32, 1997.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.1-17, 1999.

BUYS, E. M., NORTJÉ, G. L., JOOSTE, P. J. AND VON HOLY, A. Microbiological shelf life of bulk-packaged *Musculus gluteus medius* supplemented with dietary vitamin E. **Meat Science**, v.55, p.441-433, 2000.

CASTELO-BRANCO, M. A. A., BORGES, A. S. A microbiota da carcaça e da carne ovina tratada com ácido acético, embalada a vácuo e maturada por 48 dias. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.22, n.3, 2002.

CASTILLO, A.; DICKSON, J. S.; CLAYTON, R. P.; LUCIA, L. M.; ACUFF, G. R. Chemical dehairing of bovine skin to reduce pathogenic bacteria and bacteria of fecal origin. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.5, p.623-625, 1998a.

CASTILLO, A.; LUCIA, L. M.; GOODSON, K. J.; SAVELL, J. W.; ACUFF, G. R. Use of hot water for beef carcass decontamination. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.1, p. 19-25, 1998b.

CASTILLO, A.; LUCIA, L. M.; GOODSON, K. J.; SAVELL, J. W.; ACUFF, G. R. Comparison of water wash, trimming, and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.7, p. 823-828, 1998c.

CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. **Food microbiology**, v.22, p.505-512, 2005.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p.532-537, 1993.

CHURCH, I.J; PARSONS, A.L. Modified atmosphere packaging technology: a review. **Journal Science Food Agricultural**, n.67, p.143–152, 1995.

CLAROS M. C. ; CITRON D. M. ; GOLDSTEIN E. J. C. Survival of anaerobic bacteria in various thioglycolate and chopped meat broth formulations. **Journal of clinical microbiology**, v.33, n.9, p.2505-2507, 1995.

CODEX ALIMENTARIUS. **Recommended international code of hygienic practice for fresh meat.** Roma, v. 10, p. 83-111, 1994.

COLLINS, M.A.; RODRIGUES U.M.; DAINTY R.H.; EDWARDS R.A.; ROBERTS T.A. Taxonomic studies on a psychrophilic Clostridium from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. Nov. **FEMS Microbiology Letters**, n.96, p.235-240, 1992.

COLLINS, M.A.; RODRIGUES U.M.; DAINTY R.H.; EDWARDS R.A.; ROBERTS T.A. Taxonomic studies on a psychrophilic Clostridium from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. Nov. **FEMS Microbiology Letters**, v.96, p.235-240, 1992.

DAINTY, R.H.; EDWARDS, R. A., HIBBARD, C. M. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. **Journal of Science Food and Agricultural**, v.49, n.4, p.473-486, 1989.

DAVIS, T.; HENDERSON, I.; BREHM, J. K. ; MINTON, N. P. Development of a transformation and gene reporter system for group II, non-proteolytic Clostridium botulinum type B strains. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v.2, n.1, p.59-69, 2000.

DESMARCHELIER, P. M.; HIGGS, G. M.; MILLS, L.; SULLIVAN, A. M.; VANDERLINDE, P. B. Incidence of coagulase positive Staphylococcus on beef carcasses in three Australian abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.221-229, 1999.

DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; VAN IMPE, J. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. **International Journal of Food and Microbiology**, v.41, p.231-238, 1998.

DICKINSON, J.H., KROLL, R.G., GRANT, K.A. The direct application of polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.212-216, 1995.

DORSA, W.; CUTTER, C.; SIRAGUSA, G. Long-term effect of alkaline, organic acid, or hot water washes on the microbial profile of refrigerated beef contaminated with bacterial pathogens after washing. **Journal of Food Protection**, v.61, n.3, p.300-306, 1998.

DOYLE, M. E. Survival and growth of bacterial pathogens on raw meat during chilling. **Food Research Institute**, University of Wisconsin, Madison, 2002.

DUFFY, G.; WALSH, D.; SHERIDAN, J. J.; LOGUE, C. M.; Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0°C and 10°C. **Food Microbiology**, v.17, n.6, p. 571-578, 2000.

HARRINGTON, D.; BLAIR, I. S. ; MCDOWELL, D. A. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0°C and 10°C. **Food Microbiology**, v.17, n.6, p.571-578, 2000.

DYKES, G. A.; MOORHEAD, S. M. Survival of *Campylobacter jejuni* on vacuum or carbon dioxide packaged primal beef cuts stored at -1.5 °C. **Food Control**, v.12, n.8, p.553-557, 2001.

EAMENS, G.J.; GILL, P.A.; WALKER, K.H.; CRONIN, J.P. A study of the foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria* and *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia. **Communicable Diseases Intelligence**, v.27, n.2, 2003.

EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J.; VERMANDE, P.; PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfection using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Enviroment International**, v.30, p.891-900. 2004

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C. E.; MARCHESAN, M. A.; PÉRCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v.13, n.2, p.113-117, 2002.

EUSTACE, I.; MIDGLEY, J.; GIARRUSSO, C.; LAURENT, C.; JENSON, I.; SUMNER, J. An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.1, p.23-27, 2007.

FARAH, M.I.S.S. Avaliação da eficácia de saneantes frente bactérias ácido-termorresistentes isoladas do processamento de sucos de laranja. **Dissertação** (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

FARBER, J. M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology. A review. **Journal Food Protection**, n.54, p.58–70, 1991.

FLÔRES, M.L.; NASCIMENTO, V.; TROGLIO, I.I.; KADER, A.; SANTOS, L.R.; PONTES, A.; SALLE, T.; LOPES, R.F.F. Métodos de extração de dna para a detecção de *salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.315-318, 2001

FRANSEN, N. G.; ELZEN, A. M. G.; URLINGS, B. A. P.; BIJKEN, P. G. H. Pathogenic microorganisms in slaughterhouse sludge: a survey. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.33, p. 245-256, 1996.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, Ch.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, n.5, p. 372-379, 1991.

GILL, C. O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Journal of Meat Science**, v. 43, p.99 -109. 1996

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C. The effects of residual oxygen concentration and temperature on the degradation of the colour of beef packaged under oxygen-depleted atmospheres. **Meat Science**, v. 39, p.387-394, 1995a.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C. The use of oxygen scavengers to prevent the transient discolouration of ground beef packaged under controlled, oxygen-depleted atmospheres. **Meat Science**, v.41, n.1, p.19-27, 1995b.

GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**, Londres, v.43, p.99-109, 1996.

GILL, C.O. MAP and CAP of fresh red meats, poultry and offals. **In: Principles of modified-atmosphere and sous-vide packaging.** J.M. Farber, K.M. Dodds (eds). **Technomic Publishing**, Lancaster, PA. p.105-136, 2005.

GILL, C.O. Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological conditions of meat. **Journal of Food Protection**, v.67, n.2, p.413-419, 1994.

GILL, C.O.; DESLANDES, B.; RAHN, K.; HOUDE, A.; BRYANT, J. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.1050-1058, 1998.

GILL, C.O.; NEWTON, K.G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**, Londres, v.2, n.3, p.207-17, 1978.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of animal science**, Colorado, v.75, p.249-257, 1997.

HAKKINEN, M.; HEISKA, H.; HANNINEN, M.L. Prevalence of *Campylobacter* spp. in cattle in Finland and antimicrobial susceptibilities of bovine *Campylobacter jejuni* strains. **Applied and environmental microbiology**, v.73, n.10, p. 3232-3238, 2007

HELPS, C.R.; HARBOR, D.A.; CORRY, E.L. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estherteticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p.56-65. 1999.

HIELM, S.; BJÖRKROTH, J.; HYYTIÄ, E.; KORKEALA H. Genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II by pulsed-field gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n. 2, p.703-708, 1998.

HOLLEY, R.A.; PEIRSON, M.D.; LAM, J.; TAN, K.B. Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork of normal or short storage life. **International Journal Food Microbiology**, v.97, p.53-62, 2004.

HUFFMAN, R. D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. **Meat Science**, v.62, n.3, p. 285-294, 2002.

HYYTIÄ, E.; BJÖRKROTH, J.; H. SEBASTIAN; KORKEALA, H. Characterisation of *Clostridium botulinum* groups I and II by randomly amplified polymorphic DNA analysis and repetitive element sequence based PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, n.3 1, p.179-189, 1999.

INSAUSTI, K.; BERIAIN, M. J.; PURROY, A.; ALBERTI, P.; GORRAIZ, C.; ALZUETA, M. J. Shelf life of beef from local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. **Journal of Meat Science**, v. 57, p.273- 281, 2001.

JEREMIAH, L.E. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short – or long-term distribution. **Food Research International**, Barking, v.34, n.9, p.749-72, 2001a.

JEREMIAH, L.E.; GIBSON, L.L. The influence of storage temperature time on color stability, retail properties and case-life of retail-ready beef. **Food Research International**, Barking, v.34, n.9, p.818-26, 2001b.

JERICO, K. W. F.; BRADLEY, J. A.; GANNON, V. P. J.; KOZUB, G. C. Visual demerit and microbiological evaluation of beef carcasses: methodology. **Journal of Food Protection**, v. 56, n.2, p.114-119, 1993.

JOHNSEN, G.; KRUSE, H.; HOFSHAGEN, M. Genotyping of *Campylobacter jejuni* from broiler carcasses and slaughterhouse environment by amplified fragment length polymorphism. **Poultry Science**, v.85, p.2278-2284, 2006.

JONES R. J. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, n.3, p.273-282, 2004.

JONES, D. T., WOODS, D.R., Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiology. Review.**, Amsterdam, v.50, p.484-524, 1986.

KABUKI, D.Y., SOARES, C.M., SOUZA, R.M., KUAYE, A.Y. Avaliação da produção de enterotoxinas e do complexo proteico NHE em *Bacillus cereus* isolados de produtos lácteos. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 23, 2005, Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia. CD-ROM.

KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; FIELD, R.A. Characteristics of psychrotrophic *clostridium laramie* causing spoilage of vacuum-packaged refrigerated fresh and roasted beef. **Journal of food Protection**, v.56, p.13-17, 1993.

KENNEDY, C.; BUCKLEY, D.J.; KERRY, J.P. Display life of sheep meats packaged under atmospheres of various volumes and compositions. **Meat Science**, Londres, v.68, n.4, p.649-58, 2004.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. **Environment International**, v.30, n.1, p.47-55, 2004.

KONGMUANG, U., LUK, J.M.C., LINDBERG, A.A. Comparison of three stool processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2 and D by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.12 p.3072-3074, 1994.

KORKEALA, H.; BJÖRKROTH, K.J. Spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages, **Journal Food Protection**, n.60, p.724–731, 1997.

KUNIGK, L.; GOMES, D. R.; FORTE, F.; VIDAL, K. P.; GOMES, L. F.; SOUSA, P. F. The influence of temperature on the decomposition kinetics of peracetic acid in solutions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 217 - 220, 2001.

LABADIE, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, Londres, v.52, n.3, p.299-305, 1999.

LAGATOLLA, C.; DOLZANI, L.; TONIN, E. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.10, p.2440-2443, 1996.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K.I. Shelf life extension and microbiology safety of fresh meat – a review. **Food microbiology**, v.8, p.267-297, 1991.

LAWSON, P.; DAINTY, R.H.; KRISTIANSEN, N.; BERG, J; COLLINS, M.D.; Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. **Letters in Applied Microbiology**, n.19. p.153-157, 1994.

LEE, K.; YOON, C. Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0 °C. **Meat Science**, v. 59, p.71-77, 2001.

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**, v.26, n.2, p.231-243, 1995.

LEITÃO, M.F.F, Controle microbiológico da qualidade no processamento industrial de bovinos. In: **Ciência e tecnologia de carne bovina**. Campinas: CTC/ITAL, p.89-96, 1995.

LEITÃO, M.F.F. Aspectos microbiológicos das carnes. In: **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Editora Varela, 1-5, 2003.

LOVLAND, A. & KALDHUSDAL, M. Liver lesions seen at slaughteras an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, p. 345– 351, 1999.

LINDSTROM, M.; KETO, R.; MARKKULA, A.; NEVAS, M.; HIELM, S.; KORKEALA, H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E e F in food and fecal material. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p.5694-5699, 2001.

LUND, B. PECK, W., Heat resistance and recovery of epores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated, processed foods with an extended shelf-life, **Journal Applied Bacteriology**, v.76, p.115-128, 1990.

MACEDO, N.T.S.; SAND, S.T.V. Characterization of microorganisms present in a slaughterhouse and beef processing/chilling environment. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.2, p.139-146, 2005.

MADDEN, R.H.; MURRAY, K. A.; GILMOUR, A. Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, n.2, p.115-119, 2007.

MANTIS, F.; BURRIEL, A.; SABATAKOU, O.; VACALOPOULOS, A.; RAMANTANIS, S. Some factors determining the shelf life of vacuum packed heattreated Greek sausages. **Veterinarski arhi**, v. 77, n.3, p.229-235, 2007.

MARRIOT N.G. Sanitizers.Cap.8. In: **Principles of food sanitation**. 4 ed. P.139-157. Kluwer Academic Publishers. 1999.

MATTOS, I. L.; SHIRAIISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDES, J.R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, 2003.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147–179, 1999.

MESQUITA, A. Q.; RAUECKER, U. N.; FRANÇA, L.; DEL'ACQUA, T. V.; MESQUITA, A. J.; NUNES, I. A. *Clostridium estertheticum* em superfície de meias carcaças de bovino e cortes cárneos comerciais. In: III CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – CONPEEX, 3, 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia, 2006. n.p.

MORAES, M.S.V.; ANDRADE, N.J; CHAVES, J.B.P; PASSOS F.J.V.; GOMIDE, L.A.M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanitizantes químicos. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, 1997.

NACMCF. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Generic HACCP for raw beef. **Food Microbiology**, v.10, p. 449-488, 1993.

NASCIMENTO, M.S.; SILVA, N.; CATANOZI, M.P.L.; SILVA, K.C. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal Food Technology**, v.6, n.1, p.63-68, 2003.

NEL, S.; LUES, J. F. R.; BUYS, E. M.; VENTER, P. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 667-674, 2004.

NEWTON, K.G., HARRISON, J.C.L., WAUTERS, A.M. Source of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. **Journal Applied Bacteriology**, London, v.45, n.1, p.75-82, 1978.

NISHI, L. M.; FARIA, A.F. Composições gasosas em sistemas de embalagens com atmosfera modificada para carne bovina. **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, n.353, p,54-59, 2006.

NISSEN, H.; SORHEIM, O.; DAINTY, R. Effects of vacuum, modified atmospheres and storage temperature on the microbial flora of packaged beef **Food Microbiology** v.13, n.3, p.183-191, 1996.

NORTJÉ, G. L.; NEL, L.; JORDAAN, E.; BADENHORST, K.; GOEDHART, G.; HOLZAPFEL, W. H.; GRIMBEEK, R. J. A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p. 411-417, 1990.

ODLAUG, T.E.; PFLUG, I.J. Sporicidal properties of chlorine compounds: applicability to cooling water for canned foods. **Journal Milk Food Tecnolgy**. v.7, n.39, p.93-498, 1976.

OLIVEIRA, E.C. Influência de sanitizantes na qualidade de mamão de safra e entresafra minimamente processado. **Dissertação** (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 110p. 2001.

OLIVEIRA, F. R. *Clostridium estertheticum* em leite cru e em queijo parmesão e provolone. 2007. 69f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

OLIVEIRA, R. B. P.; OLIVEIRA, A. L.; GLORIA, M. B. A. Avaliação de bactérias lácticas de carne bovina embalada a vácuo quanto à atividade antimicrobiana. **Brazilian Journal Microbiology**, v.39, n.2, p.368-374, 2008.

PASSOS, R. B. Efeitos de dois tipos de embalagem a vácuo e de um monoglicerídeo acetilado (DFG) na microbiota deterioradora e patogênica da carne bovina armazenada sob refrigeração. 1991. 138 f. **Dissertação** (mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

PENHA, M.D.L.; BALDASSI, A.; CORTEZ, A.; PIATTI, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J. Detecção dos genes alfa, beta, épsilon em amostras de *Clostridium perfringens* isolados de bovinos pela reação de cadeia da polimerase. **Arquivos Instituto de Biologia**, v.72, n.3, p.277-281, 2005.

PHILLIPS, C.A. Review: modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.463-479, 1996.

PIN, C.; GARCÍA DE FERNANDO, G.D.; ORDÓÑEZ, J.A., Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p.4441–4447, 2002.

PLAATJIES, Z.; LUES, J.F.R.; BUYS, E.M.; VENTER, P. Staphylococcal growth in fresh vacuum packed red meat at various storage conditions, **Proceedings: 8th World Congress on Environmental Health**; p22- 27, 2004.

POND, J.M.; STONE, D.M.; ALDERMAN, D.J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Aquaculture**, v.261, n.1, p.194-203, 2006.

PRENDERGAST, D. M.; DALY, D. J.; SHERIDAN, J. J.; McDOWELL, D. A.; BLAIR, I.S. The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relationship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs. **Food Microbiology**, v.21, p. 589-596, 2004.

RAJALA-MUSTONEN, R. L.; TOIVOLA, P. S.; HEINONEN-TANSKI, H. Effects of peracetic acid and UV irradiation on the inactivation of coliphages in wastewater. **Water Science Technology**, v.35, n.11/12, p.237-41,1997.

RAUECKER, U. N.; DEL'ACQUA, T. V.; MESQUITA, A. Q., NUNES, I. A.; MESQUITA, A. J.. Detecção de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* incriminados na deterioração de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo através da técnica de PCR. In: III CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG -CONPEEX, 3, 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do III Seminário de Pós-graduação da UFG** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006.

RAUECKER, U. N.; NUNES, I. A.; MIGUEL, M. P.; RAMOS, R. R.; PUÇA, M. L. L.; FRANÇA, L.; MORI, A.; BUENO, C. P.; MESQUITA, A. J. Detecção de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* incriminados na deterioração de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo, através da técnica de PCR. In: II CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG -CONPEEX, 2, 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos do II Seminário de Pós Graduação da UFG** [CD-ROM], Goiânia, 2005. n.p.

RAVEENDRAN, J. V.; STEVEN, C. I.; ALAN R.M., GRAHAM, A. J. Anaerobic microbiology of fresh beef packaged under modified atmosphere or vacuum. **Journal of Food Science**, v.58, n.5, p.935–938, 1993.

REID, C. A.; SMALL, A.; AVERY, S. M.; BUNCIC, S. Presence of food-borne pathogens on cattle hides. **Food Control**, Guildford, v. 13, p. 411-415, 2002.

RESENDE, J.G.O. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloroisocianurato de sódio. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 85p. 2005.

RIDELL, J.; KORKEALA, H. Special treatment during slaughtering in Finland of cattle carrying an excessive load of dung: meat hygiene aspects. **Meat Science**, Barking, v. 35, p.223-228, 1993.

RIEDEL, G. **Controle sanitário de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320 p.

ROBERTS T.A. Taxonomic studies on a psychrophilic Clostridium from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. Nov. **FEMS Microbiology Letters**, v.96, n.2, p.235-240, 1992.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MØRETRØ, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.3, p.372-383, 2007.

ROÇA, R. O. **Microbiologia da carne**. UNESP, Campus de Botucatu, 2004. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm#s5>> Acesso em: 12 out. 2008.

ROÇA, R.; CARAMORI JÚNIOR, J.; GOMES, L.; JOAQUIM, C. Avaliação da contaminação microbiana durante o abate Kasher de bovinos. **Higiene Alimentar**; v.16, n.96, p.82-87, 2002.

ROÇA, R.O., SERRANO, A.M. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.9, n.35, p.8-13, 1995.

ROÇA, R.O., SERRANO, A.M. Operações de abate de bovinos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8, n.34, p.14, 1994.

ROSA, V. P.; KABUKI; D. Y.; KUAYE, A.Y. Identificação dos locais de contaminação por *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* em frigoríficos exportadores de carne bovina embalada a vácuo. **In: IV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes.**, 2007, Campinas. **Anais do IV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes.** Campinas - SP : Ital,. v. 1. p. 1-4. 2007.

ROSSONI, E. M. M. ; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p.81-85, 2000.

ROSSEN, L.; NORSKOV, P., HOLMSTROM, K. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, p.37-45, 1992.

RUSSEL, J.B.; RYCHLINK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v.29, n.2, 2001.

SAGRIPANTI, J.L.; BONIFACINO, A. Comparative sporicidal Effects of liquid chemical agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 545-551, 1996.

SAIKI, M.Y. Ocorrência de toxinas em carne bovina salgada e levemente dessecada, embalada a vácuo e inoculada com *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium botulinum*. **Dissertação** (mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de alimentos. Unicamp. 2002.

SAKALA, R.M.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; HIRATA, T., MAKINO, U.; FUKUSHIMA, A.; YAMADA, T.; KANEUCHI, C.; OGAWA, M.; Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage **International Journal of Food Microbiology**, v.74, n.1-2, p.87-99, 2002

SAKATE, R. I. Prevalência, epidemiologia, caracterização sorológica e molecular de *Listeria monocytogenes* isoladas na criação intensiva de novilhos superprecoces e em abatedouros frigoríficos no Estado de São Paulo. **Tese de doutorado**. São Paulo; s.n; 2005. 95 p

SAMALLA, K.; CRESSWELL, N.; MENDONCA-HAGLER, L.C.; WOLTERS, A.; ELSAS, J.D. Rapid DNA extract protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.78-85, 1993.

SANDS,R.L. Industrial perspectives on the microbial contamination of food. **European Food & Drink Review**, v.24, p.74-75, 1991.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. Embalagem a vácuo e com atmosfera modificada para carnes frescas. In: CETEA, Ital (Org.) **Embalagens para produtos cárneos**. Campinas, SP: CETEA, 1991, p. 1-20.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Carnes, aves, pescados e derivados. In: SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p.151-171.

SATHISH, S.; SWAMINATHAN, K. Molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: analysis of cross-contamination. **Veterinary Anaerobes & Diseases**, v.14, p.190-199, 2008.

SERDENGECTI, N.; IBRAHIM, Y.; GOKOGLU, N. Effects of sodium lactate, sodium acetate and sodium diacetate on microbiological quality of vacuum-packed beef during refrigerated storage. **Journal Food Safety**, v.2, p.62-71, 2006.

SHERIDAN, J. J. Sources of contamination during slaughter and measures for control. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 18, n. 4, p. 321-339, 1998.

SCHEU, P. M.; BERGHOF, K.; STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v.15, n. 1, p. 13-31, 1998.

SILVA, J. A. Extensão da vida de prateleira da carne bovina pela utilização desanitizantes físicos e químicos. **Tese** (Doutor), Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, São Paulo, 1995. 119 p.

SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.35-45, 2002.

SMALL, A.; REID, C. A.; AVERY, S. M.; KARABASI, L. N.; CROWLEY, C.; BUNCIC, S. Potential for the Spread of *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Campylobacter* in the Lairage Environment at Abattoirs. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6, p. 931-936, 2002.

SOUZA, J.B.; DANIEL, L.A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E.coli*, colfagos e *C.perfringes* em água com elevada concentração de matéria orgânica. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.10, n.2, 2005.

SPRING, S.; MERKHOFFER, N.W.; KROPPESTEDT H.H.; STACHEBRANDT, E. Characterization of novel psychrophilic clostridia from a Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *Laramiense* subsp. nov. **International Journal Of Systematic And Environmental Microbiology**, v. 53, 1019-1029. 2003.

TORDER. **Sanitation in food processing**. 2 Ed. Academic Press, USA. 1993.

TSAI, C. T., KUO, C. T., LIN, S. T. Analysis of organic halides in hospital waste sludge disinfected using sodium hypochlorite (NaOCl). **Water Research**, v.33, p.778-784, 1998

VAN DONKERSGOED, J.; JERICHO, K. W. F.; GROGAN, H.; THORLAKSON, B. Preslaughter hide status of cattle and the microbiology of carcasses. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, p.1502-1508, 1997.

VANDERLINDE, P. B; SHAY, B; MURRAY, J. Microbiological quality of Australian beef carcass meat and frozen bulk packed beef. **Journal of Food Protection**, Queensland, v. 4, n. 61, p. 437-443, 1998.

VASCONCELOS, E. C., ZAPATA, J. F. F., FIGUEIREDO E. A., Pathogens on cattle hides. **Food Control**, v. 13, p.411-415, 2002.

WANG , R.F.; CAO, W.W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727 – 736, 2003.

WHYTE, P.; MCGILL, K.; MONAHAN, C.; COLLINS, J. The effect of sampling time on the levels of micro-organisms recovered from broiler carcasses in a commercial slaughter plant . **Food Microbiology**, v. 21, n.1, p. 59-65, 2004.

WIJTZES, T.; WIT, J.C.; HUIS, J.H.J.; VAN'T RIET, K.; ZWIETERING, M.H. Modelling bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of acidity and temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.2533-2539, 1995.

WULLT, M.,; ODENHOLT, I.; WALDER, M. Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *clostridium difficile* spores. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.24, n.10, p.765-768, 2003.

YALÇIN, S.; NIZAMLIOGLU, M.; GÜRBÜZ, Ü. Fecal coliform contamination of beef carcasses during the slaughtering process. **Journal of Food Safety**, v. 21, n. 4, p. 225-231, 2001.

YUAN, Z.; NI, Y.; VAN HEININGEN, A. R. P. Kinetics of peracetic acid decomposition, Part I: Spontaneous decomposition at typical pulp bleaching conditions; Part II: pH effect and alkaline hydrolysis. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 75, p. 37 – 47, 1997.

ZHAO, X.; ZHANG, T.; ZHOU, Y.; LIU, D., Preparation of peracetic acid from hydrogen peroxide. Part I: Kinetics for peracetic acid synthesis and hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 271, p. 246-252, 2007.