



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

PRESENÇA DE ESPOROS DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS MESÓFILAS E PSICOTRÓFICAS EM MASSAS CÁRNEAS CRUAS COMERCIAIS DESTINADAS A ELABORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS COZIDOS E CURADOS

Tamires D. de **Oliveira**^{1a}; Míriam G. **Marquezini**^{1b}; Ana Lúcia da Silva C. **Lemos**^{1b}; Valéria C. A. **Junqueira**^{2b}; Renata **Bromberg**^{1c}

Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Carnes¹, Centro de Controle e Qualidade de Alimentos²

Nº 16239

RESUMO

O conhecimento da diversidade e das concentrações das bactérias esporuladas anaeróbias mesófilas e psicrotróficas com potencial patogênico ou deteriorante em matérias primas cárneas e ingredientes usados no processamento de produtos cárneos cozidos e curados, pode levar a adoção de medidas efetivas de intervenção para o controle desta microbiota. Estas informações são de grande relevância para que a indústria de carnes possa garantir a segurança microbiológica de seus produtos, assim como garantir a qualidade dos mesmos. As metodologias de produção e detecção de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrotróficas utilizadas neste estudo possibilitaram a recuperação dos esporos presentes em massas cruas de formulações comerciais de mortadela. Verificou-se a presença de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrotróficas em 79% das amostras de massas cruas de mortadelas analisadas. Nas amostras em que foi confirmada a presença de esporos a grande maioria (98,2%) apresentou contagens reduzidas, inferiores a $1,5 \times 10^1$ NMP/g. Apenas 1,8% das amostras apresentaram contagens superiores a $1,0 \times 10^2$ NMP/g.

Palavras-chaves: esporos, *Clostridium botulinum*, produtos cárneos curados, mortadela

^aBolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos; ^bColaborador; ^cOrientador, renatab@ital.sp.gov.br



ABSTRACT

The knowledge of the diversity and concentrations of anaerobic mesophilic and psychrotrophic sporulated bacteria with pathogenic or spoilage potential found in raw meat materials and ingredients used in the processing of cooked and cured meat products can lead to the adoption of effective intervention measures for the control of the microbiota. This information is of great importance for meat industries to assure microbiological safety and quality of their products. The methodologies for the production and detection of anaerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria spores used in this study allowed their recovery from the raw batter of bologna commercial formulations. The presence of spores of anaerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria was detected in 79% of samples of raw batter of bologna analyzed. Among the positive samples, the vast majority (98.2%) presented reduced counts, below 1.5×10^1 NMP/g. Only 1.8% of the samples presented counts above 1.0×10^2 NMP/g.

Keywords: spores, *Clostridium botulinum*, cured meat product, bologna

1. INTRODUÇÃO

A carne e os produtos cárneos são ótimos substratos para o crescimento microbiano, sendo estes alguns dos alimentos mais perecíveis que se têm disponíveis para alimentação humana. A composição destes alimentos é o principal motivo responsável pela rápida proliferação de microrganismos, pois estes contêm elevado teor de água e diferentes compostos ricos em nutrientes como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, sais minerais, vitaminas e açúcares. A microbiota presente em carnes é heterogênea, sendo constituída por bactérias mesófilas e psicrótróficas provenientes do próprio animal, água, solo, equipamentos e utensílios utilizados no processamento.

A mortadela, por possuir características intrínsecas, como elevada atividade de água e altos teores de nutrientes, constitui um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Por se tratar de um produto cárneo embalado a vácuo, este apresenta as condições necessárias para o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004). Esta bactéria caracteriza-se por ser anaeróbia estrita, produtora de esporos e, portanto, altamente resistente a diversos agentes químicos e físicos. Divide-se em dois grupos, o proteolítico e o não proteolítico, que além de produzirem tipos distintos de toxinas botulínicas, apresentam diferentes requerimentos de crescimento e produção de esporo. É possível ocorrer a produção de toxina de



Cl. botulinum nas mortadelas, principalmente pelo fato destas serem pasteurizadas (tratamento térmico que visa destruir as células bacterianas em estado vegetativo), armazenadas em temperatura ambiente e, por se tratarem de produtos consumidos sem aquecimento prévio.

A indústria de produtos cárneos toma medidas para assegurar a preservação e a segurança de seus produtos, minimizando o risco de germinação de esporos de *Cl. botulinum* e a produção da toxina botulínica. Para tanto, ela adota medidas como Boas Práticas de Fabricação, para evitar a contaminação de seus produtos durante seu processamento, combinadas com o uso de agentes físicos e químicos, tais como tratamento térmico, sais, pH, agentes conservantes, embalagens, tempo e temperatura de estocagem. O armazenamento da mortadela sob refrigeração, em temperaturas inferiores às necessárias para a germinação dos esporos de *Cl. botulinum*, se constituiria em uma medida alternativa para garantia da segurança deste produto. Porém, esta medida não parece ser viável visto que as altas temperaturas que se registram no Brasil, especialmente em áreas de maior consumo deste produto, regiões Norte e Nordeste, fazem com que a cadeia de frio não seja adequada para a garantia da segurança.

É importante que se determinem quais são as incidências de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrótróficas em massas cárneas cruas comerciais que são usadas na elaboração de mortadelas estáveis em temperatura ambiente. Desta forma pode haver um dimensionamento dos riscos que este produto pode oferecer ao consumidor, o que favorecerá a tomada de decisões para a garantia de sua segurança.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

As amostras de massas cruas de mortadela estáveis em temperatura ambiente foram coletadas em plantas processadoras de produtos cárneos cozidos localizadas no estado de São Paulo. Foi analisado um total de 57 amostras de massas de mortadelas as quais foram congeladas e encaminhadas até o laboratório de microbiologia de carnes do Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL.

De acordo com os dados fornecidos pelas plantas processadoras das mortadelas analisadas as amostras apresentaram atividade de água entre 0,950 e 0,973, teores de nitrito entre 300 e 900ppm e adição de 40 a 60% de carne mecanicamente separada (CMS).



2.2. Preparo dos microrganismos

2.2.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados como controle positivo dos testes foram: a cultura de *Clostridium sporogenes* PA3679 para determinação de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e as culturas de *Clostridium estertheticum* NCIMB12511 e *Clostridium gasigenes* DMS12272 para determinação de esporos de bactérias anaeróbias psicrotróficas. As condições de ativação e manutenção são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de cultivo das culturas de bactérias.

Microrganismos	Condições de cultivo	
	Ativação	Manutenção
<i>Cl. sporogenes</i>	TGM ^a (35°C/24h)	CMM ^b (4°C)
<i>Cl. estertheticum</i>	TPGY ^c (7°C/14d)	CMM (4°C)
<i>Cl. gasigenes</i>	TPGY (7°C/7d)	CMM (4°C)

^aCaldo Tioglicolato

^bCaldo de Carne Cozida

^cTrypticase-Peptona-Glicose-Extrato de Levedura

2.2.2. Produção de esporos

O método de referência usado para o preparo da solução de esporos foi o de MAH et al. (2009). A solução de esporos de *Cl. sporogenes* foi preparada conforme o método selecionado, porém para o preparo das soluções de esporos de *Cl. estertheticum* e *Cl. gasigenes* ajustou-se a temperatura de incubação para 7°C por 7 dias durante as transferências no caldo Trypticase-Peptona-Glicose-Extrato de Levedura (TPGY) e, para 40 dias durante a etapa de esporulação.

2.3. Detecção de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrotróficas em massas cruas de mortadelas

Os métodos analíticos selecionados para a quantificação de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrotróficas foram preconizados pela *American Public Health Association* – APHA (FRANK e YOUSEF, 2004) para amostras de leite fluido e queijo e foram adaptados para a análise de carnes e produtos cárneos, substituindo o Meio Reforçado para Clostrídios (RCM) pelo Caldo de Carne Cozida (CMM). Para a quantificação de esporos de bactérias anaeróbias psicrotróficas foram alteradas as temperaturas do choque térmico para 60±1°C por 30min e de incubação para 28°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em NMP/g, após comparação com a tabela de cálculo de Número Mais Provável (NMP) disponibilizada pelo *Bacteriological Analytical Manual* – BAM



(BLODGETT, 2006). Esta técnica de inoculação proporciona um limite mínimo de detecção de 0,3NMP/g.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de esporos

O método de esporulação de MAH et al. (2009) possibilitou a obtenção de concentrações elevadas de esporos (na ordem de 10^7 UFC/mL) das três espécies de *Clostridium* (*Cl. gasigenes*, *Cl. estertheticum* e *Cl. sporogenes*) usadas como controles positivos dos testes de avaliação da presença de esporos nas massas cruas de mortadela. De acordo com a metodologia usada, apesar do tempo de obtenção dos esporos ser relativamente longo, especialmente para as espécies psicrófilas (68 dias para o *Cl. gasigenes* e *Cl. estertheticum* e 18 dias para o *Cl. sporogenes*), as concentrações de esporos obtidas possibilitaram determinar a eficiência dos testes de detecção de esporos anaeróbios mesófilos e psicrófilos.

3.2. Detecção de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrófilas em massas cruas de mortadelas

Os resultados da quantificação de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrófilas nas amostras de massas cárneas cruas comerciais de mortadela são apresentados na Tabela 2 e Figuras 1 e 2.

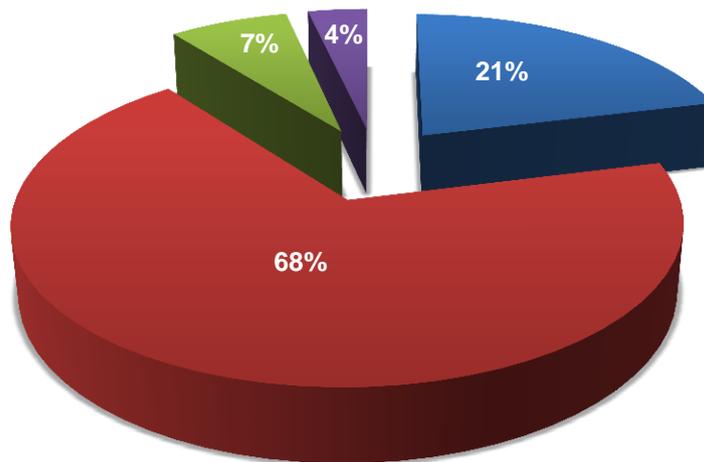
Verificou-se a presença de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrófilas na maior parte das 57 amostras de massas cruas de mortadela analisadas. Em 21% das amostras analisadas não se pôde confirmar a presença de esporos de ambos os grupos pesquisados, pois estas amostras apresentaram contagens inferiores aos limites de detecção dos métodos utilizados. Nas amostras em que foram confirmadas a presença de esporos, a grande maioria (75% e 63%, respectivamente para esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrófilas) apresentou contagens reduzidas, entre 0,3 e $1,5 \times 10^1$ NMP/g. Em um total de 1,8% dessas massas cruas de mortadelas verificou-se contagens superiores a $1,0 \times 10^2$ NMP/g.



Tabela 2. Incidência de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrotróficas em amostras de massas cruas de mortadela.

Plantas processadoras	n*	Esporos de bactérias anaeróbias mesófilas (% de amostras)		Esporos de bactérias anaeróbias psicrotróficas (% de amostras)	
		Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
A	9	0	100	0	100
B	6	100	0	83	17
C	33	90	10	97	3
D	9	100	0	100	0
Total	57	79	21	79	21

*número de amostras



■ <0,3NMP/g ■ 0,3 - 9,2NMP/g ■ 9,3 - 1,5x10¹NMP/g ■ 1,6x10¹ - 2,4x10²NMP/g

Figura 1. Contagens de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas em massas cruas de mortadelas.

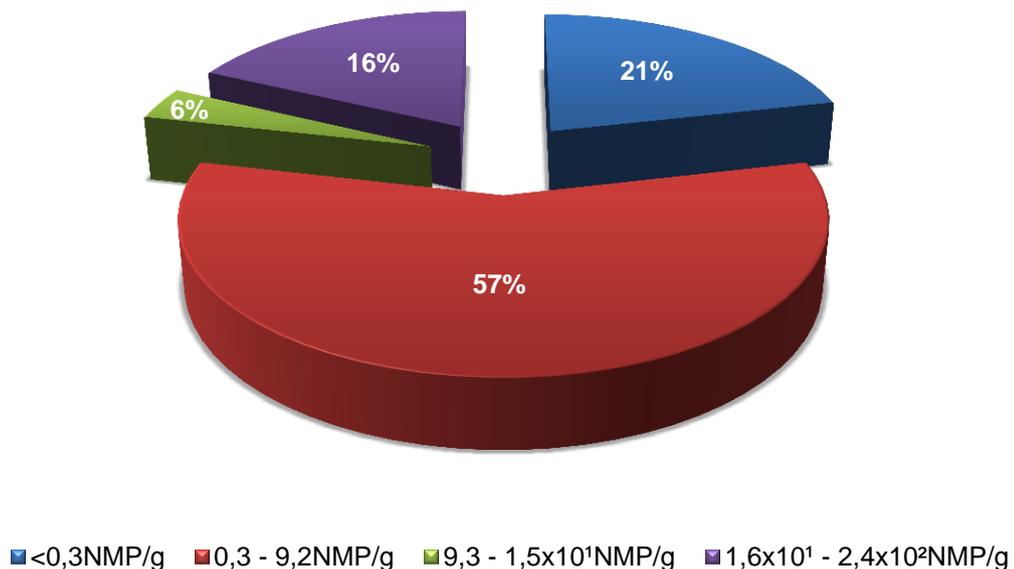


Figura 2. Contagens de esporos de bactérias anaeróbias psicrótróficas isoladas em massas cruas de mortadelas.

Alguns trabalhos já realizados corroboram com os resultados obtidos neste estudo. GREENBERG et. al. (1966) realizaram um estudo para quantificar e isolar esporos de *Cl. botulinum* em amostras de carnes cruas. A conclusão que tiveram do estudo é que o nível de contaminação de esporos em carne crua é muito baixo, ocorrendo raramente a contaminação do produto. STRINGER et. al. (2011) realizaram um estudo de determinação do potencial de produção de toxina botulínica durante a vida útil de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Estes concluíram que a probabilidade de crescimento de *Cl. botulinum* e formação de toxina neste produto pode ser reduzida, mas é possível que ocorra a 5°C após 28 dias de armazenamento. GLASS e MARSHALL (2013) verificaram que a prevalência de esporos de *Cl. botulinum* em carnes e produtos cárneos é inferior a 10%, sendo que a carga de esporos geralmente se apresenta em números muito baixos e sua distribuição varia por região geográfica. Segundo estes autores, a presença da bactéria *Cl. botulinum* em concentrações reduzidas apresenta um desafio para a segurança dos produtos cárneos.

Em outras matrizes de alimentos também já foi verificada a presença dos esporos de *Cl. botulinum*. RAGAZANI et. al. (2008) realizaram um estudo para determinar a presença de esporos de *Cl. botulinum* em amostras de mel comercializadas em seis diferentes estados brasileiros, e verificaram a incidência de esporos em 61% das 100 amostras analisadas. DUTRA et. al. (2005)



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

realizaram um estudo que detectou a presença de esporos de *Cl. botulinum* em uma das amostras de cama de frango usadas para alimentar bovinos de corte e leite, nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

4. CONCLUSÃO

Verificou-se a presença de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrotróficas em 79% das amostras de massas cruas de mortadelas analisadas. Nas amostras em que foi confirmada a presença de esporos a grande maioria (98,2%) apresentou contagens reduzidas, inferiores a $1,5 \times 10^1$ NMP/g, enquanto que em apenas 1,8% das amostras analisadas apresentaram contagens superiores a $1,0 \times 10^2$ NMP/g.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida.

6. REFERÊNCIAS

BLODGETT, R., Appendix 2 – **Most probable number from serial dilutions**. In: US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online, Revision February 2006. Disponível em: <[http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriological Analytical Manual BAM/default.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm)>. Acesso em: 25/01/2016.

DUTRA, I. S.; DÖBEREINER, J.; SOUZA M. A. **Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango**. Pesq. Vet. Bras. vol.25 no.2 Rio de Janeiro. 2005

FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. **Tests for groups of microorganisms**. In: Wehr, H. M.; Frank, J.F. (Eds.), Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed. American Public Health Association, Washington, D. C., Chapter 8, Section 8.090 and 8.100, p. 239-242, 2004.

GLASS, K.; MARSHALL, K. **Clostridium botulinum**. In: J. Glenn Morris, Jr; Morris, E. P. Foodborne Infections and Intoxications. 4. ed. Academic Press, Boston. cap. 27, p. 371-387, 2013.

GREENBERG, R. A., TOMPKIN, R. B.; BLADEL, B. O.; KITAKA, R. S.; ANELLIS, A. **Incidence of mesophilic Clostridium spores in raw pork, beef, and chicken in processing plants in the United States and Canada**. Swift & Company, Research and Development Center, Chicago, Illinois, v. 14, n. 5, Applied Microbiology, 1966.

MAH, J. H.; KANG, D. H.; TANG J. **Comparison of viability and heat resistance of Clostridium sporogenes stored at different temperatures**. Journal of Food Science, v. 74, n. 1, p. M23-7, 2009.

RAGAZANI, A. V. F.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; DELFINO, T. P. C.; POIATTI, M. L.; BERCHIELLI, S. P. **Esporos de Clostridium botulinum em mel comercializado no estado de São Paulo e em outros estados brasileiros**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, p.396-399, 2008.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**- São Paulo: Edgard Blüchler, Instituto Mauá de Tecnologia, 184p, 2004.

STRINGER, S. C.; ALDUS, C. F.; PECK, M. W. **Demonstration of the safe shelf-life of fresh meat with respect to non-proteolytic Clostridium botulinum**. Institute of Food Research, 2011. Disponível em: <



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

<http://pork.ahdb.org.uk/media/72703/demonstration-of-the-safe-shelf-life-of-fresh-meat-with-respect-to-non-proteolytic-clostridium-botulinum-final-report.pdf> >.