



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



**“EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ESPOROS DE *Clostridium estertheticum* e
Clostridium gasigenes EM CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO E
CAPACIDADE DE *Clostridium estertheticum* DE FORMAR BIOFILMES.”**

MARISA EMIKO KAWAICHI
Bióloga

Dr. ARNALDO YOSHITERU KUAYE
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

***Campinas* – SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

K179e Kawaichi, Marisa Emiko
Efeito da inoculação de esporos de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo e capacidade de *Clostridium estertheticum* de formar biofilmes / Marisa Emiko Kawaichi . -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

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

1. *Clostridium estertheticum* . 2. *Clostridium gasigenes*. 3. Estufamento. 4. Carne bovina. 5. Biofilme. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Effect of inoculated spores of *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* on vacuum packaged meat and ability of *Clostridium estertheticum* to form biofilm.

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Clostridium estertheticum*, *Clostridium gasigenes*, Blown pack, Meat, Biofilm

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Valéria Christina Amstalden Junqueira

Luciana Miyagusku

Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos

MARISA EMIKO KAWAICHI

**“EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ESPOROS DE *Clostridium estertheticum* e
Clostridium gasigenes EM CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO E
CAPACIDADE DE *Clostridium estertheticum* DE FORMAR BIOFILMES.”**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título
de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
(Membro)

Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro Suplente)

Dra. Luciana Miyagusku
(Membro Suplente)

"Nós só podemos ver perfeitamente com o coração; o que é essencial é invisível aos olhos. Os homens têm esquecido esta verdade. Mas tu não deves esquecê-la. Tu tornas-te eternamente responsável por tudo aquilo que cativas."

Antoine de Saint-Exupéry

**Dedico este trabalho especialmente
aos meus pais Hidemi e Kiyomi e
à minha avó Toyoko,
meus grandes exemplos de vida.
À minha irmã Vanessa,
e ao Flávio.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hidemi e Kiyomi, minha avó Toyoko e minha irmã Vanessa, por todo o amor, carinho, confiança e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida;

Ao Flávio, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando principalmente durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus queridos amigos: Alexandre, Daniel, Aline, Flávia, Érica, Leandro e Maurício que mesmo longe estiveram sempre presentes, com palavras de amizade, incentivo e apoio;

Ao Prof. Dr. Arnaldo Y. Kuaye pela orientação, dedicação e valiosos ensinamentos, fundamentais para a realização deste trabalho;

À Dra Valéria C. Amstalden Junqueira, ao Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício, à Dra Luciana Miyagusku, ao Prof. Dr. José Luiz Pereira pelas sugestões e correções da dissertação;

À Dra. Dirce Y. Kabuki pelos ensinamentos, amizade e apoio no desenvolvimento do trabalho;

À Dra Vanessa Pires da Rosa e Raquel Souza Massulo pelos valiosos ensinamentos, convivência e grande apoio;

À Beatriz Poker, André Maragone e Izabella Tesoto pelo grande apoio na execução do projeto, amizade e convivência;

À equipe do laboratório de Higiene e Legislação: Luciana, Celina, Vanessa, Meg, Raquel, Dirce, Isabela, Marcília, Beatriz, André, Izabela, Maria Amélia, Graciela, D. Denir por todos os momentos compartilhados, incentivo e amizade;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao departamento de Tecnologia de Alimentos pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do trabalho;

À CAPES pela bolsa de estudo concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro à pesquisa;

A todos os funcionários e colegas de pós-graduação do DTA/FEA/UNICAMP pela amizade, apoio e colaboração;

Ao Fábio Mormesso da Sealed Air Cryovac por conceder as embalagens para a realização do ensaio;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito Obrigada!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA CARNE	3
1.1.1 <i>Microbiologia da carne embalada a vácuo.</i>	4
1.2 <i>CLOSTRIDIUM</i> PSICRÓFILOS E PSICRÓFILOS	5
1.2.1 <i>Clostridium estertheticum.</i>	6
1.2.2 <i>Clostridium gasigenes</i>	7
1.3 AGENTES QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS	8
1.4 FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS.....	11
1.4.1 <i>Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio na inativação de microrganismos aderidos na superfície de equipamentos.</i>	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENES</i> EM CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO E ARMAZENADAS A 2°C E 7°C.	16
2.1.1 <i>Preparo da suspensão de esporos de C. estertheticum e C. gasigenes.</i>	16
2.1.2 <i>Preparo das amostras de carnes</i>	17
2.1.3 <i>Inoculação dos esporos e estocagem.</i>	17
2.1.4 <i>Contagem de microrganismos psicrófilos anaeróbios.</i>	18
2.1.4.1 <i>Confirmação das colônias por PCR.</i>	19
2.1.5 <i>Contagem de esporos de C. gasigenes e C. estertheticum de amostras de carne.</i>	20
2.1.5.1 <i>Identificação das colônias por PCR.</i>	21
2.1.6 <i>Avaliação visual das amostras</i>	21
2.1.7 <i>Análise de pH</i>	21
2.1.8 <i>Análise de Cor instrumental</i>	21
2.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICIÊNCIA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENES.</i>	22
2.2.1 <i>Cepas utilizadas e forma de cultivo.</i>	22
2.2.2 <i>Preparo de suspensão de esporos.</i>	22
2.2.3 <i>Preparo das soluções de ácidos orgânicos.</i>	22
2.2.4 <i>Teste da atividade dos ácidos sobre esporos de C. estertheticum e C. gasigenes.</i>	23
2.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME IN VITRO EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL.....	24
2.3.1 <i>Preparação dos corpos de prova.</i>	24
2.3.2 <i>Cepas utilizadas e forma de cultivo.</i>	24
2.3.3 <i>Formação do biofilme sobre a superfície de aço inoxidável.</i>	24
2.3.4 <i>Avaliação da formação de biofilmes</i>	25
2.3.4.1 <i>Contagem de C. estertheticum.</i>	25
2.3.4.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	25
2.3.5 <i>Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilme de C. estertheticum</i>	25
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENS</i> EM CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO E ARMAZENADA A 2°C E 7°C.....	28
3.1.1 <i>Evolução da contagem de microrganismos psicrófilos anaeróbios de amostras de carne bovina embaladas a vácuo inoculadas com C. gasigenes e C. estertheticum.</i>	28
3.1.1.1 <i>Confirmação das colônias de C. estertheticum e C. gasigenes pela técnica de PCR.</i>	32

3.1.2	<i>Evolução da contagem de esporos nas amostras de carne bovina embalada a vácuo e inoculadas com C. gasigenes e C. estertheticum</i>	34
3.1.2.1	Confirmação das colônias de esporos de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> pela técnica de PCR.	38
3.1.3	<i>Avaliação visual das amostras</i>	39
3.1.4	<i>Medida de pH</i>	42
3.1.5	<i>Avaliação de cor instrumental</i>	45
3.2	AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICIÊNCIA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENES</i>	48
3.3	FORMAÇÃO DO BIOFILME IN VITRO SOBRE SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL.....	50
3.3.1	<i>Observação de formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura</i>	53
3.3.2	<i>Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilmes de C. estertheticum</i>	59
4.	CONCLUSÕES	62
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	INTRODUÇÃO	1
1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA CARNE	3
1.1.1	<i>Microbiologia da carne embalada a vácuo</i>	4
1.2	<i>CLOSTRIDIUM</i> PSICRÓFILOS E PSICRÓFILOS	5
1.2.1	<i>Clostridium estertheticum</i>	6
1.2.2	<i>Clostridium gasigenes</i>	7
1.3	AGENTES QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS	8
1.4	FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS.....	11
1.4.1	<i>Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio na inativação de microrganismos aderidos na superfície de equipamentos</i>	14
2.	MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1	EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENES</i> EM CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO E ARMAZENADAS A 2°C E 7°C.	16
2.1.1	<i>Preparo da suspensão de esporos de C. estertheticum e C. gasigenes</i>	16
2.1.2	<i>Preparo das amostras de carnes</i>	17
2.1.3	<i>Inoculação dos esporos e estocagem</i>	17
2.1.4	<i>Contagem de microrganismos psicrófilos anaeróbios</i>	18
2.1.4.1	Confirmação das colônias por PCR.....	19
2.1.5	<i>Contagem de esporos de C. gasigenes e C. estertheticum de amostras de carne</i>	20
2.1.5.1	Identificação das colônias por PCR.....	21
2.1.6	<i>Avaliação visual das amostras</i>	21
2.1.7	<i>Análise de pH</i>	21
2.1.8	<i>Análise de Cor instrumental</i>	21
2.2	AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICIÊNCIA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENES</i>	22
2.2.1	<i>Cepas utilizadas e forma de cultivo</i>	22
2.2.2	<i>Preparo de suspensão de esporos</i>	22
2.2.3	<i>Preparo das soluções de ácidos orgânicos</i>	22
2.2.4	<i>Teste da atividade dos ácidos sobre esporos de C. estertheticum e C. gasigenes</i>	23
2.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME IN VITRO EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL.....	24
2.3.1	<i>Preparação dos corpos de prova</i>	24
2.3.2	<i>Cepas utilizadas e forma de cultivo</i>	24
2.3.3	<i>Formação do biofilme sobre a superfície de aço inoxidável</i>	24
2.3.4	<i>Avaliação da formação de biofilmes</i>	25
2.3.4.1	Contagem de <i>C. estertheticum</i>	25
2.3.4.2	Microscopia eletrônica de varredura	25
2.3.5	<i>Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilme de C. estertheticum</i>	25
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENS</i> EM CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO E ARMAZENADA A 2°C E 7°C.....	28
3.1.1 <i>Evolução da contagem de microrganismos psicofílicos anaeróbios de amostras de carne bovina embaladas a vácuo inoculadas com C. gasigenes e C. estertheticum</i>	28
3.1.1.1 Confirmação das colônias de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> pela técnica de PCR.....	32
3.1.2 <i>Evolução da contagem de esporos nas amostras de carne bovina embalada a vácuo e inoculadas com C. gasigenes e C. estertheticum</i>	34
3.1.2.1 Confirmação das colônias de esporos de <i>C. estertheticum</i> e <i>C. gasigenes</i> pela técnica de PCR.....	38
3.1.3 <i>Avaliação visual das amostras</i>	39
3.1.4 <i>Medida de pH</i>	42
3.1.5 <i>Avaliação de cor instrumental</i>	45
3.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DA EFICIÊNCIA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE ESPOROS DE <i>C. ESTERTHETICUM</i> E <i>C. GASIGENS</i>	48
3.3 FORMAÇÃO DO BIOFILME <i>IN VITRO</i> SOBRE SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL.....	50
3.3.1 <i>Observação de formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura</i>	53
3.3.2 <i>Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilmes de C. estertheticum</i>	59
4. CONCLUSÕES	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
6. APÊNDICE	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da formação de biofilme baseada na capacidade adaptativa de microrganismos proposta por Monds e O'Toole (2009).....	13
Figura 2: Reação de formação do ácido peracético.....	15
Figura 3: Contagem de microrganismos anaeróbios psicrófilos de amostras de carnes inoculadas com <i>Clostridium gasigenes</i> e seus respectivos controles negativos (sem inóculo), armazenadas a 2°C e 7°C.....	28
Figura 4: Contagem de microrganismos anaeróbios psicrófilos de amostras de carnes inoculadas com <i>Clostridium estertheticum</i> e seus respectivos controles negativos (sem inóculo), armazenadas a 2°C e 7°C.....	29
Figura 5: Amostra de carne apresentando completa deterioração devido à intensa formação de gases e exsudato viscoso e de coloração vermelho escuro a esverdeado.....	32
Figura 6: Comparação entre a contagem das amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i> e armazenadas a 2°C (item 3.1.1) e contagem de esporos (item 3.1.3).....	36
Figura 7: Comparação entre a contagem das amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i> e armazenadas a 7°C (item 3.1.1) e contagem de esporos (item 3.1.3).....	36
Figura 8: Comparação entre a contagem das amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i> e armazenadas a 2°C (item 3.1.1), confirmação de colônias pelo método da PCR (item 3.1.2).....	37
Figura 9: Comparação entre a contagem das amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i> e armazenadas a 7°C (item 3.1.1), confirmação de colônias pelo método da PCR (item 3.1.2) e contagem de esporos (item 3.1.3).....	37
Figura 10: Pontuações atribuídas à análise visual das amostras de carne: 0 - embalagens íntegras, que não apresentaram formação de gases, 1 – embalagens com início de formação de gases, apresentando bolhas, 2 - embalagens com evidência de perda de vácuo, 3 - embalagens com pequeno estufamento, 4 - embalagens estufadas, mas sem distensão, 5 - embalagens completamente estufadas.....	40
Figura 11: Resultados de pH das amostras de carne inoculadas com esporos de <i>C. gasigenes</i> e seus respectivos controles negativos, estocados a 2°C e 7°C.....	44

Figura 12: Resultados de pH das amostras de carne inoculadas com esporos de <i>C. estertheticum</i> e seus respectivos controles negativos, estocados a 2°C e 7°C.....	45
Figura 13: Diferença total de cor da superfície das amostras de carne embaladas a vácuo e inoculadas com esporos de <i>C. gasigenes</i> (B e D) e seus respectivos controles negativos (A e C) em relação à amostra inicial.....	46
Figura 14: Diferença total de cor da superfície das amostras de carne embaladas a vácuo e inoculadas com esporos de <i>C. estertheticum</i> (B e D) e seus respectivos controles negativos (A e C) em relação à amostra inicial.....	46
Figura 15: Evolução da formação de biofilme pela cepa DSM 8809 ^T e isolado nº 13 de <i>C. estertheticum</i> a 10°C sobre cupons de aço inoxidável.....	51
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície de aço inoxidável em aumento de 4500X.....	54
Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável apresentando adesão e formação de biofilme pela cepa isolada de <i>C. estertheticum</i> nº13 nos seguintes tempos de incubação: a) 05 dias em aumento de 4500x, b) 10 dias em aumento de 4500x, c) 15 dias em aumento de 4500x e d) 20 dias em aumento de 4500x.....	55
Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável apresentando formação de biofilme pela cepa de <i>C. estertheticum</i> nº 13 após 25 dias de incubação: a) em aumento de 1300x e b) em aumento de 4500X.....	55
Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável apresentando adesão e formação de biofilme pela cepa padrão de <i>C. estertheticum</i> , nos seguintes tempos de incubação: a) 05 dias em aumento de 4500x, b) 10 dias em aumento de 4500x, c) 15 dias em aumento de 4500x e d) 20 dias em aumento de 4500x.....	56
Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável apresentando formação de biofilme pela cepa padrão de <i>C. estertheticum</i> no tempo de incubação de 25 dias, nos seguintes aumentos: a) 1500X, b) 4500x e c) 6000X mostrando a formação de microcolônias.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos ensaios para inoculação de esporos de <i>C. gasigenes</i> em amostras de carne.....	18
Tabela 2: Distribuição dos ensaios para inoculação de esporos de <i>C. estertheticum</i> em amostras de carne.....	18
Tabela 3: Preparo das soluções de ácidos orgânicos.....	23
Tabela 4: Distribuição dos ensaios para avaliação da eficiência dos sanitizantes em biofilmes de <i>C. estertheticum</i> em cupons de aço inoxidável.....	26
Tabela 5: Porcentagem de colônias positivas e a respectiva contagem equivalente de log.UFC/g das amostras de carne inoculadas com esporos de <i>C. estertheticum</i> e mantidas a 2°C.....	32
Tabela 6: Porcentagem de colônias positivas e a respectiva contagem equivalente de log.UFC/g das amostras de carne inoculadas com esporos de <i>C. estertheticum</i> e mantidas a 7°C.....	33
Tabela 7: Contagem (log UFC/g) das amostras de carne inoculadas com esporos de <i>C. gasigenes</i> e incubadas a 2°C e 7°C.....	34
Tabela 8: Contagem (log UFC/g) das amostras de carne inoculadas com esporos de <i>C. estertheticum</i> e incubadas a 2°C e 7°C.....	35
Tabela 9: Monitoramento visual das amostras de carne inoculadas com <i>C. gasigenes</i> , com pontuações atribuídas de acordo com a Figura 3	39
Tabela 10: Monitoramento visual das amostras de carne inoculadas com <i>C. estertheticum</i> , com pontuações atribuídas de acordo com a Figura 5	40
Tabela 11: Resultado do fator de inativação (log UFC/mL) dos ácidos orgânicos sobre esporos de <i>C. estertheticum</i>	48
Tabela 12: Resultado do fator de inativação (log UFC/mL) dos ácidos orgânicos sobre esporos de <i>C. gasigenes</i>	49
Tabela 13: Resultados da contagem em placas de <i>C. estertheticum</i> aderidos na superfície de cupons de aço inoxidável, ao longo do tempo.....	51
Tabela 14: Efeito de sanitizantes sobre biofilmes da cepa DSM 8809 ^T de <i>C. estertheticum</i>	59

Tabela 15: Efeito de sanitizantes sobre biofilmes da cepa de <i>C. estertheticum</i> isolado nº13.....	60
Tabela 16: Resultado das contagem das amostras de carne inoculadas com <i>Clostridium gasigenes</i> em log UFC/g.....	73
Tabela 17: Resultado das contagem das amostras de carne inoculadas com <i>Clostridium estertheticum</i> em log UFC/g.....	73
Tabela 18: Valores de pH das amostras de carne inoculadas com <i>C. gasigenes</i>	74
Tabela 19: Valores de pH das amostras de carne inoculadas com <i>C. estertheticum</i>	74
Tabela 20: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com <i>C. gasigenes</i> e estocadas a 2°C.....	75
Tabela 21: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com <i>C. gasigenes</i> e estocadas a 7°C.....	75
Tabela 22: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com <i>C. estertheticum</i> e estocadas a 2°C.....	76
Tabela 23: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com <i>C. estertheticum</i> e estocadas a 7°C.....	76
Tabela 24: Resultado das contagens em log UFC/g após exposição dos ensaios de ácidos orgânicos sobre esporos de <i>C. gasigenes</i>	77
Tabela 25: Resultado das contagens em log UFC/g após exposição dos ensaios de ácidos orgânicos sobre esporos de <i>C. estertheticum</i>	77

RESUMO

Casos de estufamento de carne bovina embalada à vácuo, causado por *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*, mantida sob temperatura de refrigeração vêm sendo observados em diversas regiões do Brasil, principalmente no Centro-Oeste, onde foi detectada a presença destes microrganismos em ambientes de abatedouros-frigoríficos. A complexidade analítica da técnica utilizada em pesquisas com esses microrganismos faz com que sejam escassos os trabalhos que visam o controle desse tipo de deterioração. Diante do exposto e considerando-se a importância da exportação de carne para a economia brasileira, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de esporos de *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo e a eficiência esporicida *in vitro* do uso de ácidos orgânicos sobre estes microrganismos. Além disso, avaliou-se a capacidade de formação de biofilmes por *C. estertheticum* em superfície de aço inoxidável, e a eficiência de agentes químicos para sua remoção. Observou-se em carnes embaladas a vácuo, que *C. gasigenes* produzem maiores quantidades de gases, promovendo o estufamento da embalagem mais rápido em relação ao *C. estertheticum*. O primeiro indício da formação de bolhas por *C. gasigenes* foi observado aos 21 dias de incubação à temperatura de 7°C de armazenamento, enquanto que para *C. estertheticum* observou-se somente aos 35 dias na mesma temperatura. Notou-se uma produção de gás mais intensa à temperatura de armazenamento mais alta. Na carne inoculada com *C. gasigenes* houve um aumento progressivo no valor do pH, atingindo valores maiores em temperaturas mais elevadas, por volta de 49-77 dias, seguido por uma queda. Por sua vez, a inoculação com *C. estertheticum* não promoveu a mesma variação de pH, notando-se uma acentuada queda até 21-35 dias, seguido por um progressivo aumento. A utilização, de ácidos orgânicos mostrou reduzido ou nenhum efeito sobre esporos, de *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, não sendo viável sua aplicação em cortes de carnes bovinas com a finalidade de inibir ou minimizar o *blown pack*. Observou-se que tanto a cepa de *C. estertheticum* padrão DSM 8809^T quanto a cepa LHCE-13 isolada de equipamento (rolete de retirada do couro) foram capazes de formar biofilmes após 07 dias de contato com a superfície de aço inoxidável e os sanitizantes, ácido peracético (500mg/L) e peróxido de hidrogênio (200 mg/L) em contato por 15 minutos, mostraram-se eficientes no controle destes. São necessários programas de higienização mais rigorosos e efetivos para o controle de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* nos abatedouros-frigoríficos, pois eles podem estar presentes no ambiente em forma de esporos e também como biofilmes, em locais com grande acúmulo de material orgânico ou em associações com outros microrganismos.

SUMMARY

Occurrence of blown pack in vacuum packaged refrigerated meat caused by *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* have been reported by studies from several Brazilian states where these microorganisms were detected in abattoir environment such as the Midwestern region. Analytical complexity of the researches with *C. estertheticum* e *C. gasigenes* makes the studies to prevent or to control this spoilage scarce. For these reasons and it is considering the importance of Brazil's beef export to economy, the current study aim to assess the effect of inoculated spores of *C. estertheticum* and *C. gasigenes* on vacuum packaged meat and the efficiency *in vitro* of organic acid on reported microorganisms spores. Furthermore this study tested, for the first time, the ability of *C. estertheticum* to form biofilm in stainless steel surface and the use of some sanitizers to remove it. Results obtained from behavior analysis of *C. estertheticum* and *C. gasigenes* spores inoculated in vacuum packaged meat, showed us differences in growth between these microorganisms. *C. gasigenes* produced more amount of gas, leading the blown pack faster than *C. estertheticum*. The first evidence of gas bubble production by *C. gasigenes* was observed after 21 storage days at 7°C, whereas *C. estertheticum* started to produce bubbles only after 35 days at the same storage conditions. Gas production was intense in higher storage temperatures. Through the pH measurement it was possible verify that *C. gasigenes* increases progressively the pH, reaching maximum values after 49-77 days at higher storage temperatures, followed by decreasing. Moreover *C. estertheticum* do not cause variation in the pH, but it may be seen an accentuated decrease until 21-35 days, followed by an increase of the values, probably because of *C. estertheticum* ability to revert a falling pH through fast lactate fermentation, started when availability of glucose ends. Regarding to use of organic acids, there is reduced or none effect on *C. gasigenes* and *C. estertheticum* spores, it becomes this technique no viable to reduce or control blown pack in vacuum packaged meat. For the first time is demonstrate that *C. estertheticum* forms biofilm. Strains of *C. estertheticum* DSM 8809^T and *C. estertheticum* LHCE-13 isolated from abattoir equipment (leather removal drums) are able to colonize surfaces of stainless steel in 07 days. The sanitizers peracetic acid (500mg/L) and hydrogen peroxide (200 mg/L) exposure in 5-25 day-old biofilms at least 15 minutes were effective to control them. Severe and effective hygienization program is needed to control *C. estertheticum* and *C. gasigenes* in abattoir environment, mainly because they may be present on equipment surfaces in spore forms and also through biofilm formation in places with high organic material presence.

INTRODUÇÃO

O setor de carne bovina no Brasil vem merecendo destaque nos últimos anos, devido à posição do país como maior fornecedor mundial de carnes, desde o ano de 2003, segundo dados da Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2010). No ano de 2010, foram exportados cerca de 1.494.807 milhões de toneladas de equivalente carcaça, atingindo um faturamento de US\$ 4.106.400 (ABIEC, 2010). Tais dados mostram a representatividade da pecuária de corte na balança comercial brasileira.

Apesar dos índices serem otimistas, os estabelecimentos de abate de bovinos ainda encontram dificuldades de adaptação estrutural para atender ao aumento da demanda, gerando graves problemas principalmente em relação à qualidade da carne.

As características intrínsecas tais como: composição química, elevada atividade de água (Aa) e pH próximo à neutralidade, tornam a carne um produto altamente perecível e facilmente contaminado durante o abate, processamento, manipulação e armazenamento, permitindo o crescimento de uma microbiota extremamente variada, que pode causar deteriorações, alterando em um curto espaço de tempo, as características organolépticas.

O volume de transações de alimentos de origem animal é influenciado pelo cumprimento de exigentes critérios de qualidade, tanto no âmbito nacional quanto internacional. Tais questões estão relacionadas às condições higiênico-sanitárias do produto, estado de saúde do animal e conservação do meio ambiente. Assim, o mercado se torna cada vez mais restrito em relação à colocação de produtos alimentícios.

No Brasil, a Portaria 145/98 do Ministério da Agricultura tornou obrigatória a distribuição de peças desossadas de carne bovina e bubalina embalada e refrigerada. Assim, a maioria das peças de carnes é comercializada em embalagens a vácuo e mantida sob temperatura de refrigeração. Esta associação proporciona maior vida útil durante a estocagem, pois a temperatura reduzida e a ausência de oxigênio da embalagem impedem o crescimento da grande parte de microrganismos

aeróbios deteriorantes. Além disso, a dissolução do gás carbônico na fase aquosa da carne causa uma redução do pH, inibindo o crescimento principalmente, de bactérias Gram negativas. Embora a embalagem a vácuo associada a baixas temperaturas permita um tempo maior de conservação de carnes, elas ainda possibilitam o crescimento de algumas bactérias psicotróficas e psicofílicas anaeróbias estritas ou anaeróbias facultativas.

Recentemente, casos de incidências de embalagens à vácuo mantidas sob refrigeração e sem aparente abuso da temperatura, foram observadas com um tipo de deterioração incomum, onde apresentavam uma distensão da embalagem (estufamento) e presença de odores indesejáveis (sulfurosos), causados por espécies de *Clostridium* psicrófilos e psicofílicos, caracterizados como *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*.

Este problema traz prejuízos de milhões de dólares, gerando um forte impacto na marca comercial do produto. Muitos procedimentos vêm sendo empregados a fim de reduzir a contaminação de carcaças e produtos cárneos em nível de abatedouro, tais como práticas de higiene integrados com programas de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), porém somente esses procedimentos muitas vezes não evitam a contaminação de carcaças.

Torna-se importante a busca de métodos eficazes de controle destes microrganismos, removendo-os de plantas e equipamentos de abatedouros e de carnes, evitando assim a deterioração e conseqüente formação de estufamento na embalagem. A complexidade da técnica analítica envolvida em pesquisas com esses microrganismos anaeróbios faz com que sejam escassos os trabalhos que visam o controle desse tipo de deterioração.

Diante do exposto e considerando-se a importância da exportação de carne para a economia brasileira e a garantia de sua qualidade para o comércio externo e interno, neste estudo avaliou-se o comportamento de carne bovina embalada a vácuo e inoculada intencionalmente com esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* bem como a ação de agentes ácidos sobre os esporos e a eficiência da ação de agentes químicos sobre biofilmes de cepas de *C. estertheticum* formados em superfícies de aço inoxidável.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos microbiológicos da carne

A carne *in natura* é considerada um produto altamente perecível, devido às suas características intrínsecas, como: presença de substâncias nitrogenadas, minerais, composição química, elevada atividade de água (Aa) e pH. Esses fatores favorecem o desenvolvimento de microrganismos que causam deterioração alterando as características organolépticas (LEITÃO, 2003).

Inicialmente o tecido interno de animais sadios é livre de microrganismos, porém uma vez exposto, principalmente no momento do abate, pode ocorrer a contaminação microbiológica do tecido (LEITÃO, 2003). As principais fontes e rotas de contaminação de carnes frescas são: o couro, as condições de abate dos animais, particularmente o estresse *ante-mortem*, que irá influir no pH do produto final, contaminação através do trato gastrointestinal e nódulos linfáticos dos animais, mãos de manipuladores, equipamentos e utensílios, ambiente de manuseio e armazenamento (WORCMAN-BARNINKA; LANDGRAF, 2006).

Em geral, a microbiota das carnes é constituída por bactérias psicotróficas Gram negativas, não fermentativas, dos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Shewanella*, ao lado de bactérias Gram negativas fermentativas da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Aeromonas*; no grupo das bactérias Gram positivas, destacam-se principalmente *Lactobacillus* sp, *Brochothrix thermosphacta* e algumas espécies de *Clostridium* sp psicrófilos (JAY, 2005; WORCMAN-BARNINKA; LANDGRAF, 2006.).

A predominância dos diferentes gêneros e espécies de microrganismos apresenta um comportamento variável em relação ao metabolismo e às condições extrínsecas em função da conservação das carnes (LEITÃO, 2003).

Uma prática amplamente utilizada na comercialização é o emprego de embalagens a vácuo associadas com baixas temperaturas de estocagem a fim de inibir ou retardar o crescimento microbiano e consequentemente estender a vida de prateleira da carne. A ausência de oxigênio, a formação de gás carbônico e a dissolução do mesmo na fase aquosa, proporcionam a formação de ácido carbônico,

o qual é responsável principalmente pela inibição do crescimento de bactérias Gram negativas, porém, ainda assim, possibilitam o crescimento de algumas bactérias psicrófilas e psicrófilas (GILL; PENNEY, 1988). Além disso, limita o crescimento de bactérias deteriorantes, principalmente do gênero *Pseudomonas*, e permite que *B.thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas tornem-se a microbiota dominante (SAKALA et al., 2002).

1.1.1 Microbiologia da carne embalada a vácuo.

Em carnes mantidas sob anaerobiose e refrigeração, as bactérias do grupo *Lactobacillus* normalmente predominam na microbiota, devido à sua capacidade de inibir o crescimento de alguns microrganismos competidores, através da produção de bacteriocinas. Além disso, estas bactérias utilizam o aminoácido arginina que não é utilizado por outros microrganismos, permitindo um crescimento mais rápido frente à microbiota competidora, inibindo-a. (GILL; JONES, 1994,).

Porém, alguns microrganismos anaeróbios facultativos e psicrófilos da família *Enterobacteriaceae* (*Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*) também podem se multiplicar nessas condições (NYCHAS; DROSINOS; BOARD, 1998). Em geral, sua proliferação em embalagens a vácuo é limitada a produtos cárneos com pH>5,8 e submetidos às temperaturas abusivas de estocagem (GILL; BADONI, 2004),

No entanto, se a contaminação inicial de microrganismos competidores for relativamente alta, associada com carnes com elevado pH, os anaeróbios facultativos podem iniciar a degradação da carne na embalagem, mesmo na presença de uma microbiota láctica predominante (GILL, 1996).

Em 1989, pesquisadores (DAINTY; EDWARDS; HIBBARD, 1989; KALCHAYANAND et al., 1989) verificaram um tipo de deterioração incomum em carnes bovinas embaladas a vácuo, causados por *Clostridium* psicrófilo ou psicrófilo, capaz de produzir quantidades suficientes de hidrogênio e dióxido de carbono que geram distensões nas embalagens. Além da distensão aparente, odores ofensivos, causados por butanol, etanol, ácido butanóico, ácido acético, ésteres derivados destes álcoois e ácidos e odores sulfurosos também foram observados.

Segundo Broda (1996b) tal tipo de deterioração não é restrito a carnes de uma única espécie animal e sua ocorrência é verificada em produtos submetidos ao

cozimento, sugerindo que estes microrganismos sejam introduzidos na forma de esporos.

1.2 *Clostridium* psicrófilos e psicrófilicos

Desde que as espécies de *Clostridium* psicrófilos e psicrófilicos foram associadas com deteriorações e subsequente estufamento de embalagens de carne bovina à vácuo (DAINTY; EDWARDS; HIBBARD, 1989; KALCHAYANAND et al., 1989), vários estudos foram realizados para identificação e caracterização destes microrganismos (BRODA; MUSGRAVE; BELL, 2000; COLLINS, et al., 1992; DAINY; MACKEY, 1992.).

Dainty e Mackey (1992) verificaram que embora estes microrganismos apresentem as mesmas propriedades fenotípicas do gênero *Clostridium* (anaeróbios, Gram-positivos, formadores de esporos), diferem dos outros *Clostridium* produtores de butanol por crescerem a temperaturas abaixo de 20°C.

Casos de estufamento de embalagens de carne *in natura* ou cozidas tem sido relatados em diversos países como Reino Unido (DAINTY; EDWARDS; HIBBARD, 1989), Nova Zelândia (BRODA et al., 1996a, 1996b), no Brasil (MESQUITA et al., 2006; RAUECKER, 2007, ROSA; KABUKI; KUAYE, 2007) e recentemente na Irlanda (BYRNE et al., 2009).

Em 1992, Collins et al. identificaram o microrganismo isolado por Dainty, Edwards e Hibbard (1989) como sendo da espécie *Clostridium estertheticum*. Posteriormente, incidências de estufamento em carne de cordeiro embalados à vácuo foram estudados por Broda et al. (2000), que descreveram uma nova espécie de microrganismo: *Clostridium gasigenes*.

Além desses dois microrganismos, outros *Clostridium* psicrófilos e psicrófilicos também foram identificados como agentes causadores de deterioração em carne embalada a vácuo, como *C. laramiense* que provoca intensa produção de gases e é genotipicamente muito semelhante ao *C. estertheticum* (KALCHAYANAND et al., 1989; TRUPER; de'CLARI, 1997); *C. algidicarnis* e *C. putrefaciens*, que apesar de se desenvolverem a 37°C, são psicrotolerantes e foram isolados de casos de deterioração profunda em carne bovina fresca refrigerada e embalada a vácuo,

porém produzem somente deterioração por alteração de odor (BOEREMA et al., 2003; BRODA et al., 2000,).

1.2.1 *Clostridium estertheticum*

Collins et al. (1992) identificaram o novo microrganismo denominado de *Clostridium estertheticum* comparando sua seqüência parcial do gene 16S rDNA, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com a seqüência de outros *Clostridium* produtores de butanol e verificaram que o microrganismo isolado era geneticamente diferente de outras espécies.

Segundo descrição, este microrganismo é um bacilo Gram positivo móvel, produtor de esporo oval, subterminal e ligeiramente saliente da célula-mãe. Cresce a temperatura entre 1°C a 15°C e não cresce acima de 22°C, pode sobreviver a aquecimento de 80°C durante 10 minutos e é anaeróbio obrigatório. Durante o crescimento produz grande quantidades de gás (em torno de 30% H₂ e 70% CO₂) formados a partir de arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, maltose, manose, manitol, salicina, amido, sorbitol e xilose. Além disso, compostos voláteis como ácido butírico, butanol, butanoato de butila e acetato de butila são os principais componentes do espaço vazio da embalagem, junto com complexos de ésteres e compostos sulfúricos (COLLINS et al., 1992).

Broda, Boerema e Bell (2003) detectaram a presença de *C. estertheticum* em ambientes de matadouros-frigoríficos, fezes, pele de bovino e solo de abatedouros da Nova Zelândia que apresentavam incidência de estufamento de produtos cárneos embalados a vácuo. No Brasil, estudo conduzido por Rauecker (2007) verificou a presença de *C. estertheticum* em ambiente de oito abatedouros-frigoríficos de bovinos, fezes de bovinos, superfícies de meias-carcaças e em cortes cárneos refrigerados embalados a vácuo normais e estufados. *Clostridium estertheticum* também foi detectado em leite cru, queijo parmesão e queijo provolone provenientes de diferentes estados do Brasil, indicando sua disseminação no país (OLIVEIRA, 2007). Rosa, Kabuki e Kuaye (2007) isolaram *C. estertheticum* em amostras de superfícies de equipamentos, como rolete para retirada de couro e serra elétrica, carcaças e inclusive no produto final e através da utilização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase e Polimorfismo de Restrição (PCR-RFLP), verificou um

elevado nível de contaminação cruzada ao longo das etapas de processamento da carne em abatedouro-frigorífico do estado de São Paulo e Mato Grosso. Na Irlanda, em 2008, o primeiro caso de *blown-pack* em carne bovina embalada a vácuo causado por *C. estertheticum*, foi confirmado por Byrne et al. (2009) que apesar de não conseguir isolar o microrganismo, detectou a presença através da técnica de PCR e seqüenciamento de DNA.

As principais fontes de contaminação primária de *Clostridium estertheticum*, segundo Broda et al. (2002) são as fezes e peles dos animais. Esses microrganismos foram isolados a partir do conteúdo gastrointestinal, dessa forma os autores sugerem que a presença de *Clostridium estertheticum* na pele do animal pode ser explicada pela contaminação fecal durante o transporte e pré-abate.

1.2.2 *Clostridium gasigenes*

Clostridium gasigenes foi inicialmente isolado por Broda et al. (2000) a partir de carne de cordeiro embalada a vácuo, que apresentou estufamento após 14 dias, quando estocado à 2°C.

Segundo descrição de Broda et al. (2000), *C. gasigenes* consiste em bacilos Gram positivos, móveis e β -hemolíticos. São produtores de esporos elípticos e subterminais, produzidos durante a fase estacionária. Podem crescer a temperaturas entre -1,5°C a 26°C (com temperatura ótima de crescimento em torno de 20°C a 22°C). A 20°C, o pH ideal para o crescimento varia entre 5,4 e 8,9. São fermentadores de celobiose, frutose, glicose, inositol, maltose, manose, salicina e trealose, gerando compostos voláteis como etanol, acetato, butirato, lactato, butanol, dióxido de carbono e hidrogênio; são capazes de hidrolisar gelatina, esculina e amido.

De acordo com alguns estudos, a prevalência de *C. gasigenes* em ambientes de matadouro-frigorífico e em amostras de carne embaladas a vácuo é baixa em relação à frequência de detecção de *C. estertheticum* (FELIPE, 2008; RAUECKER, 2007; ROSA, 2009). Felipe (2008) e Rauecker (2007), observaram a presença de, *C. gasigenes* em amostras de carne bovina embalada a vácuo deteriorada por *blown-pack*, em apenas 18,52% (10/54) e 18,52% (5/27) respectivamente, nas amostras analisadas pela técnica de PCR. Rosa, Kabuki e Kuaye (2007) isolaram cepas de *C.*

gasigenes de equipamentos como serra elétrica e rolete de retirada do couro de uma das empresas analisadas, porém sua presença não foi detectada no produto final. Além disso, através da técnica de RFLP, constatou que os microrganismos isolados nos equipamentos pertenciam à um mesmo perfil genético.

Pond, Stone e Alderman (2006) investigaram a microbiota intestinal de uma espécie de truta (*Oncorhynchus mykiss*) e através das técnicas de RFLP e análise da sequência 16S rDNA observaram que *C. gasigenes* representava a espécie dominante entre as bactérias anaeróbias.

Apesar da baixa prevalência de *C. gasigenes*, considerada pela maioria dos estudos (FELIPE, 2008; RAUECKER, 2007; ROSA, 2009), a presença deste microrganismo em ambientes de abatedouro-frigorífico e equipamentos, pode causar a contaminação de carcaças ao longo da cadeia de produção chegando até o produto final.

1.3 Agentes químicos na descontaminação de carcaças

Os principais fatores para controlar o grau de contaminação da carne fresca são: a higienização dos locais de abate e de manipulação e a aplicação de ferramentas como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (BORGES; FREITAS, 2002). Porém, apesar destes programas controlarem ou reduzirem o nível de microrganismos, a contaminação de carcaças durante o procedimento de abate muitas vezes, ainda, é inevitável (LEITÃO, 2003).

Os métodos de descontaminação de carcaça podem ser divididos em três grandes grupos: a descontaminação física (água quente ou vapor); biológica (bateriófago, bactericinas) e química (ácidos orgânicos, cloro, polifosfatos e cloreto de sódio acidificado) (HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

Dentre as formas mais comuns de descontaminação física, pode-se citar principalmente o tratamento de carcaças com água quente em torno de 85°C, através de spray ou imersão, pasteurização em vapor d'água ou pressurização (SOFOS; SMITH, 1998). Vários estudos conduzidos com diferentes tipos de carne submetidos a variadas condições, em geral mostraram uma redução de 1-3 log

UFC/g na contagem total bacteriana e redução na prevalência de patógenos. Porém a efetividade deste método depende de alguns fatores tais como controle de temperatura da água, pressão, método de aplicação, contaminação microbiológica inicial, características do tecido cárneo, etc. (HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

A descontaminação biológica na preservação de alimentos baseia-se na capacidade de algumas bactérias, principalmente ácido lácticas de inibirem o crescimento de outros microrganismos patogênicos sem causar nenhuma alteração organoléptica no alimento. Tal inibição pode ocorrer por abaixamento do pH, através da produção de ácidos orgânicos ou pela produção de bacteriocinas que possuem efeito bacteriostático ou bactericida sobre certos microrganismos. A bacteriocina mais estudada é a nisina, produzida por *Lactobacillus lactis* susp. *lactis*, efetiva contra bactérias Gram positivas. A União Européia autoriza o uso desta substância na maturação e processamento de queijos, porém em relação ao seu uso em carcaças, ela não é muito recomendada devido à baixa efetividade contra bactérias Gram negativas (HUGAS; TSIGARIDA, 2008; JONES, et al., 2008).

Em um estudo de Jones et al. (2008), observou-se que algumas cepas de *Lactobacillus sakei* foram capazes de inibir o crescimento de *C. estertheticum* *in vitro*, porém quando esses dois microrganismos foram inoculados juntos em uma amostra de carne embalada a vácuo, não houve o impedimento da formação de blown pack. O uso deste tipo de técnica possui algumas limitações como a baixa concentração de bacteriocinas produzidas *in vivo* ou a sua inativação devido à interação com outros componentes presentes no alimento, potencial desenvolvimento de resistência dos microrganismos e características da microbiota, que podem se tornar dominantes em relação às bactérias ácido lácticas (HUGAS; TSIGARIDA, 2008; JONES, et al., 2008).

O uso de agentes químicos na sanitização de carcaças de animais recém-abatidos, destinados ao consumo humano, tem sido amplamente estudado, tendo como objetivo, eliminar microrganismos patógenos e deterioradores, visando a sanidade e aumentando a vida de prateleira da carne e recentemente com objetivo de evitar casos de estufamentos em embalagens a vácuo (BRODA, 2007; SILVA, 1999a, 1999b;).

Dentre os agentes químicos, os mais estudados são os ácidos orgânicos (ácidos láctico, acético e cítrico), mas outros agentes como cloro, ácido peracético e polifosfatos também tem sido empregados (HUGAS; TSIGARIDA, 2008).

Os ácidos acético e láctico exibem atividade bactericida e bacteriostática quando aplicadas individualmente ou em combinações (PRASAI, et al., 1991; SILVA, 1999a, 1999b) e, em geral são considerados como aditivos reconhecidamente seguros em alimentos (GRAS – *Generally Regarded as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (USDA, 1982).

Segundo Corlett e Brown (1980), a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos é atribuída às moléculas não-dissociadas, que são solúveis na membrana celular bacteriana. Somente os ácidos orgânicos lipofílicos apresentam essa atividade, pois suas moléculas penetram na membrana plasmática por difusão no citoplasma, o ácido se dissocia acidificando o interior da célula, interferindo assim no metabolismo celular ou diminuindo a atividade biológica, como resultado da redução do pH do interior da célula.

O ácido acético é largamente utilizado como acidulante e conservador em alimentos (XAVIER, 2003). Estudos mostram que a presença de 1 a 2% de ácido não dissociado, na superfície de carcaças, causa inibição bacteriana, desde que boas condições de higiene da carcaça sejam mantidas (SILVA, et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2002).

A aplicação de associações de ácidos em superfície de carnes também são empregadas (ANDERSON; MARSHALL, 1990; SILVA, 1999a, 1999b). Silva (1999a, 1999b) utilizando uma solução de ácido composta por 2% de ácido acético, 1% de ácido láctico, 0,25% de ácido cítrico e 0,10% de ácido ascórbico, verificou que a aspersão desta solução reduziu em 90% a carga microbiana da superfície da carcaça, aumentando em até uma semana a vida de prateleira do produto. Já Anderson e Marshall (1990), observaram que a mesma solução de ácidos não foi mais efetiva que o uso de ácido acético ou ácido láctico isoladamente em concentrações similares.

Apesar das características benéficas, o emprego de ácidos orgânicos apresenta algumas limitações, tais como: são ineficientes quando a população

microbiana é alta; há possibilidade de seleção de cepas resistentes com o uso extensivo e alguns países limitam o seu uso, pois os ácidos orgânicos podem ser empregados para mascarar falhas de higiene e situações de deterioração da carne (XAVIER, 2003).

A eficácia dos tratamentos de descontaminação de carcaças depende da validação e verificação da metodologia aplicada (aspersão, imersão, etc.), das características físico-químicas da carne, da ecologia microbiana do produto e a contagem inicial de microrganismos, além de fatores operacionais como: temperatura, concentração e pH da solução, tempo de exposição e estocagem, etc (HUGAS; TSIGARIDA, 2008). De acordo com Dickson e Anderson (1992), em geral, a aplicação de agentes sanitizantes pode reduzir o nível inicial de contaminação microbiológica da superfície de carcaça, em relação àquelas sem nenhum tipo de tratamento.

1.4 Formação de biofilmes por microrganismos anaeróbios.

A primeira descrição de biofilmes foi realizada por Zobell (1943), que estudando a preferência de bactérias marinhas em crescer em superfícies, verificou que a presença de matérias orgânicas e outras partículas adsorvidas nessas superfícies favoreciam o processo de adesão bacteriana. Costerton *et al.* (1995) definiu biofilmes como uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos entre si e/ou a uma superfície ou interface.

Biofilmes podem ser formados a partir do desenvolvimento de uma única espécie de microrganismo ou derivada de uma comunidade formada por múltiplas espécies, formando um vasto arranjo de superfícies bióticas e abióticas (DAVEY; O'TOOLE, 2000; MacLEOD *et al.*, 1990).

O mecanismo de adesão e conseqüente formação de biofilme em geral, é um processo dinâmico envolvendo uma série de etapas: a) adesão inicial à uma superfície, b) produção de exopolissacarídeos (EPS) que além de auxiliar na ancoragem de outras células, criando uma adesão irreversível, protege a colônia da flutuação do ambiente, c) formação de microcolônias, d) maturação das

microcolônias, e) dispersão de algumas células bacterianas do biofilme (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990; DAVEY; O'TOOLE, 2000; STOODLEY, *et.al.*, 2002).

Estudos propõem que durante a formação de um biofilme, células bacterianas podem otimizar a superfície a ser colonizada em resposta às condições ambientais, ou seja, elas podem adotar medidas adaptativas, criando microambientes durante o crescimento microbiano sobre uma superfície, resultando na formação de comunidades complexas e fenotipicamente heterogêneas (**Figura 1**) (KLAUSEN, *et al.*, 2006; MONDS; O'TOOLE, 2009)

Monds e O'Toole (2009) descrevem as seguintes etapas de formação de uma comunidade bacteriana complexa: a) duas células bacterianas aderem-se independentemente na superfície, b) cada célula tem acesso a níveis de oxigênio e nutrientes suficientes para se multiplicar e dar início à formação de microcolônias, c) com a multiplicação celular e o crescimento vertical da colônia, a difusão de oxigênio e carbono é restrita às células da base (em vermelho); estas se adaptam ao ambiente, alterando seu metabolismo e criando um ambiente anaeróbio, d) células do topo da macrocolônia, por sofrer grande ação de força mecânica, produzem mais exopolissacarídeos, que auxiliam na ancoragem e protegem outras células do estresse ambiental, e) macrocolônias desenvolvem-se, formando uma comunidade complexa com diferentes microrregiões. Estas etapas estão ilustradas na **Figura 1**.

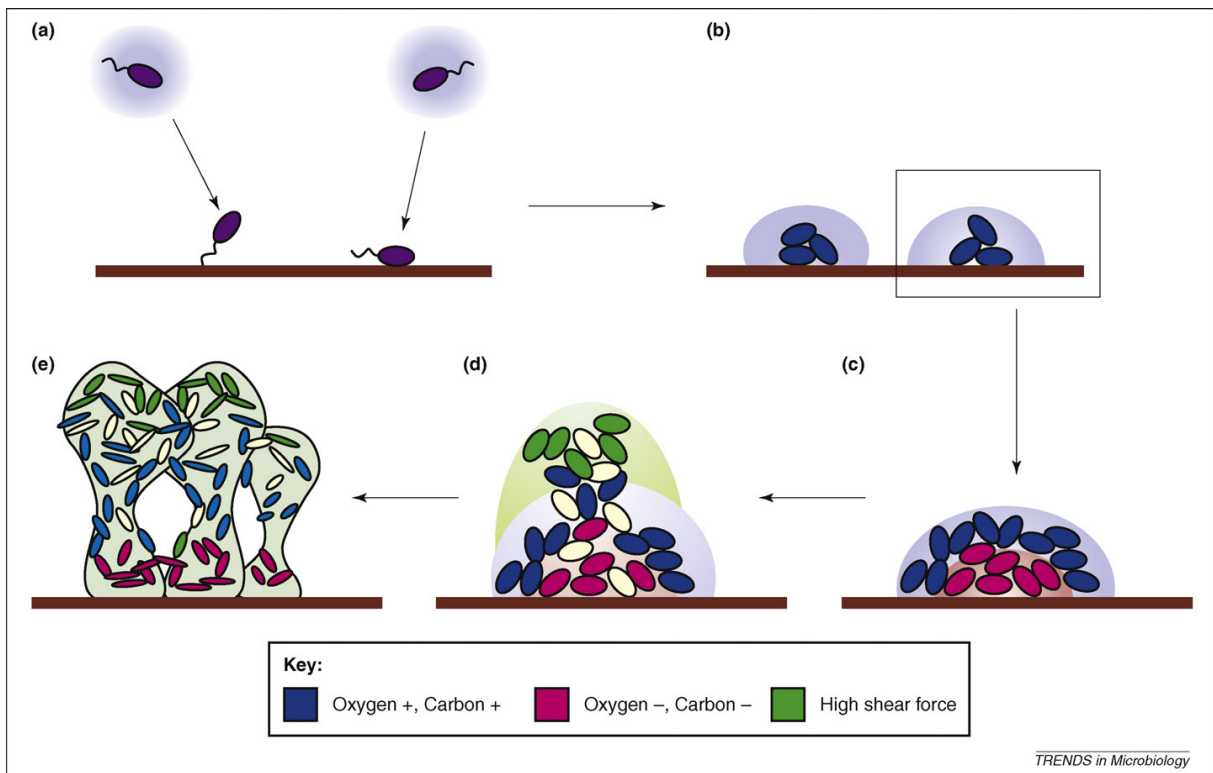


Figura 1. Etapas da formação de biofilme baseada na capacidade adaptativa de microrganismos proposta por Monds e O'Toole (2009).

O desenvolvimento de gradientes químicos, devido às diferenças de difusão de nutrientes, produtos metabólicos e oxigênio através do biofilme, gera microrregiões que permitem a associação de microrganismos com propriedades fisiológicas e físico-químicas diferentes (HUNTER; BEVERIDGE, 2005). Costerton, *et al.* (1994) através de um microeletrodo, avaliaram os diferentes níveis de oxigênio dissolvido (O.D.) ao longo da estrutura de biofilme e observaram que os valores de O.D. diminuíram no sentido da superfície para o centro, alcançando níveis quase totalmente anaeróbios no centro das microcolônias, sugerindo que microrganismos anaeróbios também podem associar-se aos biofilmes formados em ambientes aeróbios.

Microrganismos anaeróbios obrigatórios geralmente possuem mecanismos de resposta ao estresse ambiental (presença de oxigênio, dessecação e compostos antimicrobianos), entre elas, a formação de endósporos (COLLINS, *et.al.*, 1992;

JEFFERSON, 2004; VARGA; THERIT; MELVILLE, 2008). Porém estas formas existem em estado de dormência, não podendo adaptar-se rapidamente às alterações das condições ambientais (VARGA; THERIT; MELVILLE, 2008). Schie e Fletcher (1999) observaram que apesar da presença de oxigênio ser letal ou inibitória à fisiologia de anaeróbios, a presença de ar não necessariamente afeta a capacidade de adesão de alguns microrganismos. Varga, Therit e Melville (2008) demonstraram pela primeira vez a capacidade de *Clostridium perfringens* de se organizar na forma de biofilmes, em superfícies de vidro e placas de poliestireno sob condições anaeróbias.

A capacidade dos microrganismos, de persistirem aderidos às superfícies na maioria dos habitats, organizados na forma de biofilmes, pode oferecer a mesma resistência conferida por esporos às variadas situações de estresse, tais como radiação UV, mudanças de pH, osmolaridade e desidratação, além de permitir uma rápida resposta às variações ambientais. (DAVEY; O'TOOLE, 2000; FLEMMING, H.C., 1993).

1.4.1 Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio na inativação de microrganismos aderidos na superfície de equipamentos

Em indústrias de alimentos o ácido peracético, compostos clorados e peróxido de hidrogênio são amplamente utilizados (KUMAR; ANAND, 1998) para sanitização do ambiente e equipamentos.

O ácido peracético (PAA) é um sanitizante de amplo espectro de atividade e por isso é utilizado em muitas indústrias, principalmente as de processamento de alimentos (ALASRI et al., 1992). Em geral, o PAA tem se mostrado efetivo contra biofilmes contendo resíduos de alimentos e sua alta eficiência é atribuída à capacidade de oxidação do material celular (MARQUES *et al.* 2007).

É comercialmente disponível em uma mistura equilibrada de peróxido de hidrogênio, ácido peracético e água, como mostra a equação na **Figura 2** (KITIS, 2004).

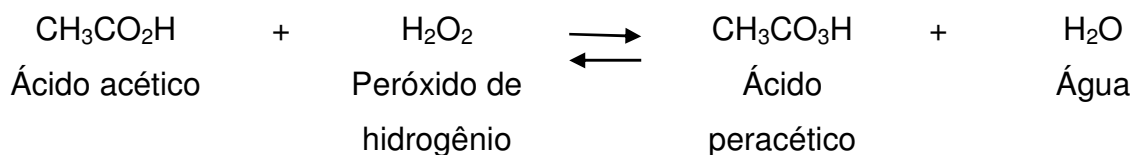


Figura 2: Reação de formação do ácido peracético.

O peróxido de hidrogênio em mistura com o ácido peracético contribui para aumentar o poder desinfetante do PAA, porém seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, acreditando-se que esteja envolvido na oxidação de grupos sulfidrílicos das proteínas microbianas. O peróxido de hidrogênio convertido em radicais hidroxilas altamente reativos, pode degradar DNA, proteínas, polissacarídeos e lipídios (PRICE; WORSFOLD; MANTOURA, 1992).

Alguns estudos mostram a efetividade destes sanitizantes a base de peróxido em biofilmes (HOLAH, et al., 1990; ROSADO, 2009). Rosado (2009) verificou que o ácido peracético promoveu uma redução de 4 log UFC/cm² de biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável.

São escassos os estudos sobre o efeito desses ácidos em *C. estertheticum*. Rosa (2007) observou que o ácido peracético em uma concentração de 500 mg/L e peróxido de hidrogênio a 200 mg/L apresentaram melhor efeito esporicida *in vitro*. Broda (2007) também observou que *in vitro* o ácido peracético promoveu uma redução de 4 log UFC/ mL de esporos de *C. estertheticum*. Porém em um estudo *in vivo*, onde amostras de carne inoculadas com esporos de *C. estertheticum* e rinsadas com ácido peracético, observou-se que a presença do ácido não eliminou o blown pack, deterioração característica deste tipo de microrganismo em carne embalada a vácuo, mas foi capaz de estender a vida útil do produto (BOEREMA, et al., 2007).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Higiene e Legislação localizado no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

2.1 Efeito da inoculação de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo e armazenadas a 2°C e 7°C.

Esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foram inoculados separadamente em amostras de carne bovina embaladas a vácuo e armazenadas sob duas diferentes condições de temperatura (2°C e 7°C), por um período de 12 semanas, que corresponde ao tempo estimado de vida de prateleira do produto. Foram realizadas 02 repetições do teste para cada microrganismo.

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

Cada cepa padrão de *C. gasigenes* DSM 12272^T e *C. estertheticum* DSM 8809^T foi inoculada em caldo PYGS [peptona (Difco, Detroit Michigan, USA), extrato de levedura (Difco), glicose (Difco) e amido (Meck, Rio de Janeiro, Brasil)] (Lund et al., 1990) pré-reduzido, e incubado em condições anaeróbias a 10°C para *C. estertheticum* e 15°C para *C. gasigenes* durante 72 e 48 horas respectivamente. Em seguida, cada microrganismo foi inoculado em um meio para esporulação pré-reduzido, descrito por Peck, Fairbair e Lund (1992). A incubação foi realizada em condições anaeróbias a 10°C por um período de até 6 meses, para a produção de esporos (PECK, FAIRBAIR e LUND, 1992; BELL, MOORHEAD e BRODA, 2001). A produção de esporos foi avaliada através de microscopia de contraste de fase, segundo Bell, Moorhead e Broda (2001).

Após o período de produção de esporos, estes foram concentrados e lavados 4 vezes por centrifugação a 4500xg por 30 min com solução salina estéril gelada [0,85% m/v NaCl (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)]. Para eliminar as células vegetativas presentes no meio, foram realizados três ciclos de sonicação por 30 segundos, seguidos de lavagem. Em cada lavagem, os esporos foram ressuspensos em 5 mL de salina estéril gelada. Ao final dos ciclos, a suspensão de esporos foi aquecida a 60°C por 10 minutos e armazenadas a -18°C até o momento do uso. A salina não é um meio capaz de induzir a germinação dos esporos, por este motivo, após a sonicação e aquecimento, os esporos voltam à fase de dormência

durante o armazenamento em baixas temperaturas (BELL, MOORHEAD e BRODA, 2000; BRODA, 2007).

2.1.2 Preparo das amostras de carnes

Peças de carne bovina resfriadas (*Gluteus medius*) foram obtidas no comércio de Campinas – SP, levadas ao laboratório e processadas assepticamente. A superfície da embalagem foi desinfetada com álcool a 70% e aberta com o auxílio de uma tesoura estéril. A peça foi imersa em água fervente durante 2 minutos e logo após, teve a camada externa retirada assepticamente e, a partir da parte interna, foram realizados cortes de aproximadamente 25 g, embalados individualmente a vácuo em um filme termoencolhível de multicamadas (20 x 40 cm, Cryovac® Sealed air, São Paulo – SP, Brasil). O termoencolhimento da embalagem foi realizado através de imersão em água quente (95°C – 100°C) seguido imediatamente por choque térmico. Após essa etapa, septos de silicone confeccionados utilizando-se uma bisnaga de vedante de silicone comercial de base acética, segundo Saiki (1991) foram fixadas em cada amostra de carne.

2.1.3 Inoculação dos esporos e estocagem

A inoculação da suspensão de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* na concentração de 10^3 ou 10^4 UFC mL⁻¹, previamente preparada (segundo o item 3.1.1), foi realizada conforme **Tabelas 1 e 2**. Antes da inoculação, a suspensão de esporos foi submetida ao choque térmico à temperatura de 80°C por 10 minutos, para simular a etapa de termoencolhimento da embalagem durante a produção de peças de carne fresca embalada à vácuo na indústria. Geralmente esta etapa é realizada por imersão em água a 87°C – 95°C ou em túnel de ar quente, seguido por um rápido resfriamento. Tal choque térmico, na indústria pode possibilitar a ativação de possíveis esporos contaminantes de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* presentes na carne.

Os grupos 1 e 2 foram inoculados com volume de 1 mL de suspensão de esporos a 10^3 – 10^4 UFC/mL submetidos ao choque térmico e armazenados a 2°C e 7°C, por um período de até 12 semanas. A inoculação foi realizada através do septo

de silicone, sem perda de vácuo. Nos grupos 3 e 4 não foram inoculados esporos e foram mantidos sob as mesmas condições de estocagem, como controles negativos.

Tabela 1: Distribuição das amostras para os ensaios de inoculação de esporos de *C. gasigenes* em carne.

Grupos	Número de amostras de carne*	
	Armazenada a 2°C	Armazenada a 7°C
1 - <i>C. gasigenes</i> (contagem)	21	21
2 - <i>C. gasigenes</i> (avaliação pH)	21	21
3 - Controle Negativo (contagem)	21	21
4. Controle Negativo (avaliação pH)	21	21

* Utilizadas num período de 12 semanas

Tabela 2: Distribuição das amostras para os ensaios de inoculação de esporos de *C. estertheticum* em carne.

Grupos	Número de amostras de carne*	
	Armazenada a 2°C	Armazenada a 7°C
1 - <i>C. estertheticum</i> (contagem)	21	21
2 - <i>C. estertheticum</i> (avaliação pH)	21	21
3 - Controle Negativo (contagem)	21	21
4. Controle Negativo (avaliação pH)	21	21

* Utilizadas num período de 12 semanas

2.1.4 Contagem de *microrganismos psicofilicos anaeróbios*

Duas amostras de cada grupo (1 a 4), armazenadas a temperaturas de 2°C e 7°C foram analisadas a cada 15 dias. A superfície da embalagem das amostras de carne foi desinfetada com álcool 70% e aberta assepticamente, com auxílio de tesoura estéril, dentro de uma câmara de anaerobiose Bactron-II (Sheldon Manufacturing Inc. Cornelius, OR). Cada amostra de 25g foi diluída em 225 mL de solução salina peptonada [0,85% NaCl (Merck) e 0,1% peptona (Difco)] pré-reduzida e homogeneizada. Para a pré-redução dos meios de cultura e soluções utilizados, estes foram mantidos dentro da câmara de anaerobiose por um período de no mínimo de 48h antes de seu uso. Em seguida foram realizadas diluições decimais

em solução salina peptonada e plaqueadas na superfície de ágar PYGS pré-reduzido. As placas foram incubadas em anaerobiose a 10°C para *C. estertheticum* e a 15°C para *C. gasigenes*, durante 7 – 10 dias (BRODA et al., 1996b; BRODA, DELACY e BELL, 1998; BELL, MOORHEAD e BRODA, 2001).

Após incubação, foram realizadas as contagens das colônias e em seguida, cinco colônias foram selecionadas de acordo com suas características morfológicas para posterior identificação através da Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com Broda, Boerema e Bell (2003).

2.1.4.1 Confirmação das colônias por PCR.

- **Extração de DNA**

As colônias selecionadas foram inoculadas separadamente em caldo PYGS, sob condições anaeróbias e incubadas às temperaturas de 10°C para *C. estertheticum* e 15°C para *C. gasigenes* durante 7 a 15 dias.

Em seguida, para a extração de DNA, foi coletada uma alíquota de 250 µL de caldo contendo os microrganismos e foi centrifugado a 13000xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 95 µL de tampão PCR 1X (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá) foi adicionado. As células foram ressuspensas e em seguida tratadas com lisozima (Sigma, St. Louis, USA) a 1 mg/mL e mantidas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Foi adicionado 200 µg/mL de proteinase K (Invitrogen, Carlsba,USA) para digestão a 60°C durante 60 minutos e logo depois submetido a 95°C durante 8 minutos para inativação da enzima. O DNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da utilização (FURRER, et al., 1991).

- **Técnica da PCR**

Para detecção de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*, foram utilizadas as seqüências de primers complementares das regiões variáveis V1 e V6 do gene 16S rDNA, de acordo com Broda, Boerema e Bell (2003).

Para *C. estertheticum*, foi utilizado o seguinte par de primer: 16SEF (forward) 5'-TCG GAA TTT CAC TTT GAG-3' e 16SER (reverse) 5'-AAG GAC TTC ACT CAT

CTC que anela nas posições 207-223 e 996-977 respectivamente no gene 16S rDNA de *C. estertheticum*, amplificando um produto final de 790 pb.

Para *C. gasigenes*, foram utilizados os primers: 16SDBF (forward) 5'-GAG AGG AGT TCT TCG GAA CGA-3' e 16SDBR (reverse) 5'-AAG CSA CTT CCC CAA TTA C-3', que anelam na posição 61-81 e 995-977 respectivamente no gene 16S rDNA, amplificando um produto final de 935pb.

Para a PCR foi utilizado uma mistura que continha 10 µl tampão PCR 10X (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá), 2 µL de dNTPs a 10 mM (Invitrogen, Carlsba,USA); 6 µL de MgCl₂ a 25 mM (Invitrogen, Carlsba,USA); 1µl de cada primer a 100 µM (Promega, Madison, USA), 0,5 µl de *Taq* polimerase a 5 U/µl (Fermentas Life Science, Ontario, Canadá) e 10 µl de DNA em um volume total de 25 µl. A amplificação do DNA foi realizada em um ciclo inicial de 92°C/3min, 30 ciclos de desnaturação a 92°C/1 min, anelamento a 55°C/1min, extensão a 72°C/2 min e ciclo final a 72°C/3min (BRODA et al., 2000).

Os produtos do gene 16S rDNA foram separados em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, Carlsba,USA) por 40-50 minutos a 90V. Ao final da corrida, o gel foi corado com SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsba,CA), visualizados por luz ultravioleta e fotodocumentados.

2.1.5 Contagem de esporos de *C. gasigenes* e *C. estertheticum* de amostras de carne

Ao mesmo tempo em que foram realizados os ensaios para contagem de *C. gasigenes* e *C. estertheticum* (item 2.1.4), foram realizadas as contagens de esporos destes mesmos microrganismos, nos mesmos intervalos de tempo, para verificar se estes voltavam a esporular ao longo do tempo de armazenamento.

Na etapa de diluição decimal, 1 mL da diluição 10⁻¹ foi transferido para 9 mL de tampão fosfato 0,1M e em seguida submetido a um choque térmico de 80°C por 10 minutos, para posterior plaqueamento em Agar PYGS suplementado com lisozima 625 unidades/mL (Sigma, St. Louis, USA) que causa degradação do córtex, permitindo a germinação e possibilitando a máxima recuperação de esporos (,

FAIRBAIR e LUND, 1992). O tempo de incubação e temperatura de armazenamento foram os mesmos descritos no item 2.1.4

2.1.5.1 Identificação das colônias por PCR

Após a contagem, foram selecionadas 05 colônias de cada placa, de acordo com as características morfológicas e identificadas como *C. gasigenes* e *C. estertheticum* conforme o item 2.1.4.1.

2.1.6 Avaliação visual das amostras

Para a avaliação visual, três amostras foram analisadas de acordo com a formação de gás, recebendo uma pontuação de 0 a 5, segundo Boerema et al., 2007. Pontuação 0 para embalagens que não apresentem bolhas, 1 para embalagens com bolhas, 2 para embalagens com evidência de perda de vácuo, 3 para pequeno estufamento, 4 para embalagens estufadas, mas sem distensão da embalagem e 5 para embalagens completamente estufadas. O intervalo de tempo da avaliação visual foi o mesmo descrito no item 2.1.4 para as análises de contagem.

2.1.7 Análise de pH

O pH das amostras de carne foi determinado de acordo com o método potenciométrico descrito pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1981). As medidas foram realizadas antes da inoculação dos microrganismos e no mesmo intervalo de tempo descrito no item 2.1.4 em amostras inoculadas com esporos (Grupo 2) e amostras controle, sem a inoculação de esporos (Grupo 4), utilizando-se um potenciômetro Foodcare, modelo HI 9110 (Hanna Instruments, USA) e eletrodo de vidro Analyser, modelo 2A13-MD.

2.1.8 Análise de Cor instrumental

Para a análise instrumental da cor foi utilizado um colorímetro modelo Colorquest II (Hunterlab, Virgínia, USA), com calibração em Reflectância Especular Excluída (RESEX), usando como sistema de cor CIELAB ($L^*a^*b^*$), iluminante D65 e um ângulo de observador de 10°C (HUNTER LAB, 1996). A leitura foi realizada nas amostras embaladas a vácuo para verificar a cor na sua forma de comercialização.

Foram analisadas as amostras embaladas a vácuo do grupo 2 - inoculadas com *C. gasigenes* e *C. estertheticum* e grupo 4 - controle negativo, sem inoculação de microrganismo, realizadas no mesmo intervalo de tempo descrito no item 2.1.4.

Cada leitura foi realizada através da média de 02 pontos (RESEX/D65/10) e como padrão de leitura, foi adotado a amostra embalada no dia seguinte à chegada da peça no laboratório, para obtenção dos valores de L* (luminosidade), a* (intensidade da cor vermelha) e b* (intensidade da cor amarela). A partir dos valores médios dos parâmetros L*, a* e b*, calculou-se a diferença total da cor (ΔE^*), dada pela equação 1.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{eq. 1})$$

2.2 Avaliação in vitro da eficiência de ácidos orgânicos sobre esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

2.2.1 Cepas utilizadas e forma de cultivo

Foram utilizadas as mesmas cepas e condições de cultivo citadas no item 2.1.1.

2.2.2 Preparo de suspensão de esporos

A suspensão de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foi preparada conforme a metodologia descrita no item 2.1.1.

2.2.3 Preparo das soluções de ácidos orgânicos

As soluções de ácidos foram preparadas em água destilada esterilizada de acordo com a **Tabela 3**, e o pH foi obtido através de um potenciômetro Foodcare, modelo HI 9110 (Hanna Instruments, USA) e eletrodo de vidro Analyser, modelo 2A13-MD.

Tabela 3: Preparo das soluções de ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos	Concentração	pH*
Ácido acético (Synth)	2% (v/v)	2,70
Ácido Lático (Synth)	2% (v/v)	2,50
Solução de ácidos	2% de ácido acético (Synth) (v/v)	2,08
	1% de ácido lático (Synth) (v/v)	
	0,25% de ácido cítrico (Merck) (m/v)	
	0,10% de ácido ascórbico (Merck) (m/v)	

* Temperatura de 24°C.

Após o preparo, os ácidos foram armazenados a temperatura ambiente até o momento do uso.

2.2.4 Teste da atividade dos ácidos sobre esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

A ação de ácidos orgânicos sobre esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foi avaliada através do método de diluição-neutralização da União Européia, conforme Wullt et al (2003). Porém, ao invés do uso de agentes sanitizantes, foram empregados ácidos orgânicos em diferentes concentrações, de acordo com o item 2.2.3. O teste foi realizado dentro da câmara de anaerobiose Bactron II. A suspensão de esporos ficou em contato com cada uma das soluções de ácidos orgânicos durante 5, 15 e 30 minutos e em seguida 0,1 mL foi neutralizada com uma solução contendo 0,2M de bicarbonato de sódio e 0,2M de carbonato de sódio, com pH 9,6 conforme descrito por Arias-Moliz et al.(2008). Ao final de cada tempo de contato, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento em ágar PYGS com incubação a 10°C para *C. estertheticum* e 15°C para *C. gasigenes*, durante 3 semanas. As colônias foram contadas e posteriormente confirmadas pela técnica PCR (item 2.1.4.1) O efeito da ação dos ácidos foi avaliado pelo valor do fator de inativação (FI), que é representado pela redução em log UFC da contagem de células viáveis após o contato com os ácidos, em relação ao inoculo inicial (WULLT et al.,2003).

2.3 Formação de biofilme in vitro em superfície de aço inoxidável

2.3.1 Preparação dos corpos de prova.

Foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304, acabamento número 4 e rugosidade de 0,366 μm , com incerteza de 7,3% (ROSADO, 2009), cortado em formato quadrado, nas dimensões de 1,0 cm x 1,0 cm, pelo Centro de Tecnologia da Unicamp.

Para a limpeza, os corpos de prova foram escovados empregando-se água e detergente neutro e enxaguados com água destilada. Em seguida, mergulhados em álcool etílico 70% por 1 hora e enxaguados com água destilada. Após esse procedimento, os cupons foram esterilizados a 121 °C durante 15 minutos (PARIZZI, 2004).

2.3.2 Cepas utilizadas e forma de cultivo

Utilizou-se a cepa de referência de *C. estertheticum* DSM 8809^T, adquirida de *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, na Alemanha e uma cepa de *C. estertheticum* (LHCE - 13) isolada da serra elétrica divisora de carcaça da linha de processamento da carne bovina embalada a vácuo (ROSA, 2007).

As culturas foram checadas quanto à sua pureza através do plaqueamento em Ágar Columbia (Difco), com 5% de sangue de carneiro (Biotério BioBoavista, Campinas-SP) e mantidas sob anaerobiose a 10 °C durante 15 dias (BOEREMA, BRODA e BELL, 2003).

Todas as etapas de cultivo foram realizadas dentro da câmara de anaerobiose Bactron-II (Sheldon Manufacturing Inc. Cornelius, OR). As cepas foram inoculadas em caldo de PYGS (LUND e PECK, 1990) pré-reduzido e incubado a 10 °C por 48 - 96 horas em anaerobiose (BRODA et al., 1996b; BRODA, DELACY e BELL, 1998; BELL, MOORHEAD e BRODA, 2001).

2.3.3 Formação do biofilme sobre a superfície de aço inoxidável

Os cupons foram imersos em tubos contendo 3 mL de caldo PYGS pré-reduzido, contendo uma suspensão de células de *C. estertheticum* entre 10^3 – 10^4

UFC/mL. Cupons imersos em caldo PYGS sem o acréscimo de *C. estertheticum* foram utilizados como controle negativo. Os tubos contendo os cupons em contato com *C. estertheticum* e os controles negativos foram incubados a 10°C por até 30 dias em anaerobiose. O meio de cultivo foi trocado a cada 5 dias.

2.3.4 Avaliação da formação de biofilmes

2.3.4.1 Contagem de *C. estertheticum*

Após 0, 5, 10,15, 20 e 25 e 30 dias de incubação a 10°C, 3 cupons foram retirados do caldo PYGS e analisados. Cada cupom retirado do caldo PYGS foi transferido assepticamente em tubos contendo 10 mL de tampão fosfato salina - PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,1M, pH 7,2 e mantidos durante 01 minuto sem agitação, a fim de eliminar as células planctônicas. Em seguida os cupons foram imersos em 5 mL do mesmo tampão e submetidos à agitação em vórtex durante 02 minutos para remoção de células sésseis. Após esse procedimento, foram preparadas diluições seriada em água peptonada a 0,1%, inoculadas em ágar PYGS e incubadas a 10°C por 10-15 dias em anaerobiose. A contagem foi realizada após o período de incubação.

2.3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

Após a contagem em placas, a formação de biofilmes na superfície dos cupons, ao longo do tempo (5, 10, 15, 20 e 25 dias) foi avaliada visualmente através de microscopia eletrônica de varredura. Dois cupons-teste de cada tratamento (com *C. estertheticum* e o controle negativo) foram preparados e fixados para observação em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM – 5800 LV, em aumentos entre 800 a 6000 vezes conforme descrito por Rosado (2009).

2.3.5 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilme de *C. estertheticum*

Para avaliar a eficiência do sanitizante sobre biofilme de *C. estertheticum* formado na superfície de aço inoxidável, foram utilizadas soluções de ácido peracético a 500 mg/L (pH 3,15) e peróxido de hidrogênio a 200 mg/L (pH 2,79),

diluídos em água destilada, de acordo com as recomendações do fabricante. Os ensaios foram realizados de acordo com a **Tabela 4**.

Os sanitizantes utilizados foram Divosan Forte® (a base de ácido peracético da JohnsonDiversey) e Virox® (a base de peróxido de hidrogênio, ácido dodecilbenzasulfônico e ácido fosfórico da JohnsonDiversey).

Tabela 4: Distribuição dos cupons de aço inoxidável nos ensaios para avaliação da eficiência dos sanitizantes sobre biofilmes de *C. estertheticum*.

Grupos	Tratamentos	Quantidade de cupons *	
		Cepa padrão	LHCE - 13
1	Solução de ácido peracético	2	2
	Solução de peróxido de hidrogênio	2	2
3	Controle positivo (cupom com biofilme sem tratamento com sanitizante)	2	2
4	Controle negativo (cupom sem o biofilme)	2	2
Total		8	8

* O teste foi repetido 2 vezes

Para cada tratamento, utilizou-se um total de 6 cupons de aço inoxidável (2 cupons por teste, repetidos por 2 vezes). Os cupons utilizados foram preparados conforme itens 2.3.1, 2.3.2, 2.3.3 para formação do biofilme.

Após essa etapa, os cupons foram rinsados em PBS para retiradas de células planctônicas, imersos em 10 mL de cada solução sanitizante durante 10 minutos e transferidos para uma solução de 10 mL de neutralizante (tiosulfato de sódio a 1%) por 10 minutos para inativação da ação do sanitizante.

Logo após a retirada da solução neutralizante, os cupons foram imersos em 5 mL de tampão PBS submetidos a vórtex por 2 minutos, e em seguida foi realizado uma diluição seriada em água peptonada 0,1% e inoculados em ágar PYGS.

A eficiência do sanitizante foi avaliada de acordo com o número de reduções (log UFC/cm²) que os cupons dos grupos 01 e 02 (tratados com sanitizantes) sofreram em relação ao grupo 03 (biofilme não tratado com sanitizantes).

2.4 Análise estatística

Todas as variáveis estudadas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e as médias individuais foram comparadas através do Teste de Tukey em nível de 95% de significância através do programa STATISTICA® 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da inoculação de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina embalada a vácuo e armazenada a 2°C e 7°C.

As amostras de carne bovina embalada a vácuo foram avaliadas através da contagem de microrganismos psicrófilos anaeróbios, análise visual com pontuações de acordo com Boerema et al. (2007) e análise de cor e pH.

3.1.1 Evolução da contagem de microrganismos psicrófilos anaeróbios de amostras de carne bovina embaladas a vácuo inoculadas com *C. gasigenes* e *C. estertheticum*

Os resultados da contagem microbiana das amostras de carne inoculadas com *C. gasigenes* e *C. estertheticum* e seus respectivos controles negativos, submetidos às diferentes temperaturas estão representados nas **Figuras 3 e 4**.

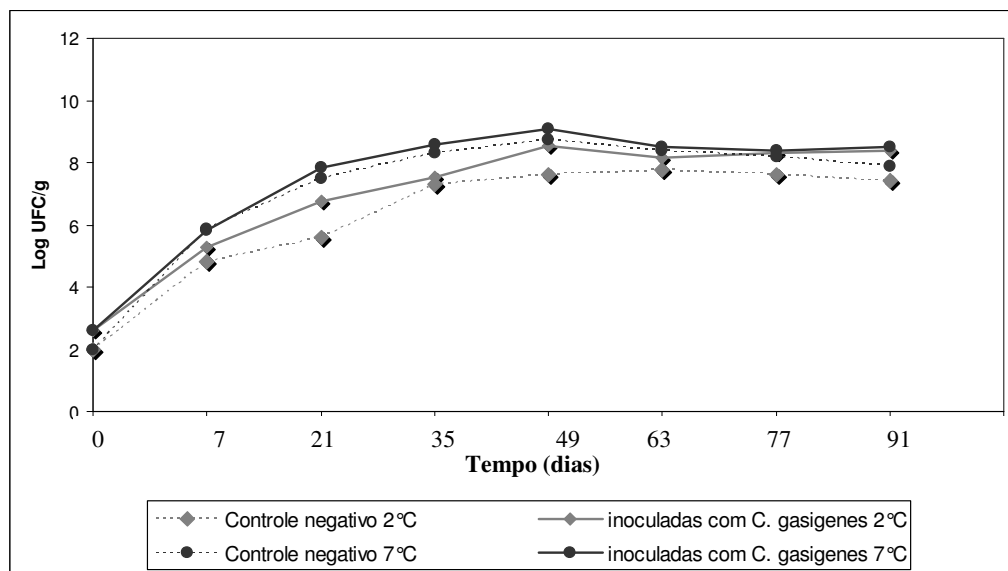


Figura 3: Contagem de microrganismos anaeróbios psicrófilos de amostras de carnes inoculadas com *Clostridium gasigenes* e seus respectivos controles negativos (sem inóculo), armazenadas a 2°C e 7°C.

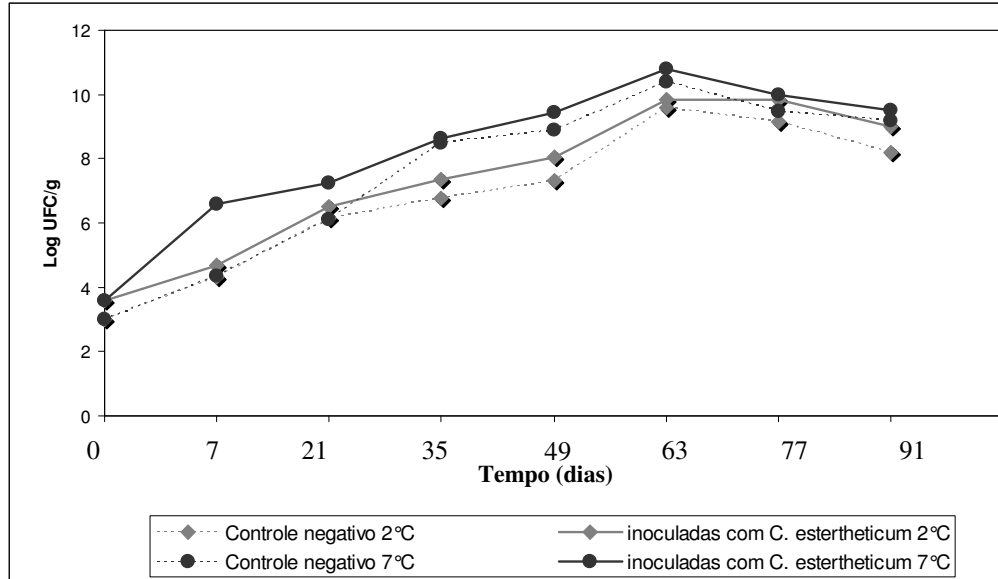


Figura 4: Contagem de microrganismos anaeróbios psicrófilos de amostras de carnes inoculadas com *Clostridium estertheticum* e seus respectivos controles negativos (sem inóculo), armazenadas a 2°C e 7°C

Verificou-se um crescimento microbiano nas amostras “controles negativos”, ou seja, sem a inoculação de *C. gasigenes* ou *C. estertheticum*. Os dados indicam que embora tenha sido realizado tratamento para remover a contaminação superficial da peça (miolo da alcatra), ainda restou uma contaminação residual natural de microrganismos anaeróbios psicrófilos (10^2 a 10^3 UFC/g). De acordo com Gill e Penney (1977), alguns microrganismos proteolíticos, quando na fase logarítmica de crescimento, são capazes de invadir e colonizar o interior de peças de carnes através da hidrólise do colágeno, permitindo ainda que outros microrganismos não proteolíticos também invadam o tecido.

A presença desta contaminação residual por outros microrganismos anaeróbios no controle negativo, no nível observado, prejudicou uma melhor avaliação do desenvolvimento microbiano nas amostras inoculadas com *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, cujo nível de inoculação foram da ordem de 10^3 a 10^4 UFC/g. Assim, para verificar a participação de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* inoculados artificialmente na contagem total de anaeróbio foi realizada a identificação das colônias pela técnica de PCR (item 2.1.4.1).

Em geral, comparando-se as amostras armazenadas a 2°C e 7°C, observou-se que quando mantidas em menor temperatura as amostras de carne apresentaram menor contagem microbiana (**Figuras 3 e 4**). E quando comparadas com seu respectivo controle negativo (não inoculado), visualmente as contagens das amostras inoculadas com *C. estertheticum* e *C. gasigenes* foram sempre maiores.

Como pode ser observado na **Figura 3**, nas amostras inoculadas com esporos de *C. gasigenes*, o crescimento de anaeróbios atingiu o maior índice a partir do 49º dia, com contagens de 8,5 e 9,1 log.UFC/g respectivamente para amostras incubadas a 2°C e 7°C. Amostras mantidas sob as mesmas condições, porém como controle negativo, tiveram as maiores contagens de anaeróbios no 63º dia, com 7,8 logUFC/g e no 49º dia com 8,7 log.UFC/g para amostras armazenadas a 2°C e 7°C, respectivamente.

Quando inoculadas com esporos de *C. gasigenes*, as amostras foram comparadas em relação às temperaturas de armazenamento e observou-se uma diferença de crescimento ($p < 0,05$) entre os dias 21 a 63 (**Tabela 16**). Aquelas mantidas a 7°C apresentaram um crescimento de microrganismos maior (logUFC/g) em relação às armazenadas a 2°C no período descrito acima.

Nas amostras inoculadas com esporos de *C. estertheticum*, o crescimento microbiano atingiu os maiores níveis de contagens somente a partir do 63º dia, com 9,8 e 10,8 log UFC/g, para as amostras armazenadas a 2°C e 7°C respectivamente. As amostras mantidas como controle negativo, atingiram maiores contagens no 63º dia com 9,6 e 10,4 log UFC/g para as temperaturas de 2°C e 7°C, respectivamente (**Figura 4**).

Estatisticamente o crescimento das amostras inoculadas com esporos de *C. estertheticum* foram diferentes ($p < 0,05$) em relação à temperatura de armazenamento, somente nos primeiros dias (7 a 21 dias). Quando comparadas com seus respectivos controles negativos, à temperatura de 2°C não houve diferença ($p < 0,05$) da contagem, ao contrário das amostras armazenadas a 7°C que apresentaram uma diferença significativa até o 21º dia.

Nishi (2008) avaliou a qualidade microbiológica de carne bovina embalada a vácuo estocadas a 0°C, 2°C, 4°C, 7°C e 10°C durante 77 dias e observou que em

temperaturas de 4°C a 10°C, a contagem máxima de psicrófilos e psicrófilos anaeróbios foi atingida entre o 7º a 21º dia, enquanto que para temperaturas mais baixas (0°C a 2°C), somente a partir do 28º dia. De acordo com estudo, apesar das contagens elevadas, os sinais de alterações nas características da carne como aparência e odor se tornaram nítidos somente em tempos mais longos de armazenamento.

No final do período de avaliação (91 dias) todas as amostras inoculadas com esporos que apresentavam um estufamento das embalagens, mostravam um exsudado viscoso e esverdeado (**Figura 5**). Estes resultados foram semelhantes aos de Kalchayanand *et al.* (1989) que observaram uma produção de exsudato rosa brilhante na carne embalada a vácuo deteriorada que alterou-se para esverdeado, provocado pela formação de sulfomioglobina, entre 10 a 12 semanas de estocagem refrigerada.

A não utilização, de um meio de cultura seletivo dificultou a contagem e posterior acompanhamento do desenvolvimento do *C. gasigenes* e *C. estertheticum* inoculado nas amostras de carne. O meio PYGS apesar de ser indicado para o crescimento de *Clostridium spp* anaeróbios e com temperatura ótima de crescimento baixa (BRODA, DELACY e BELL.,1998), é um meio não seletivo, permitindo o crescimento de outros microrganismos presentes naturalmente na carne. Devido à essa dificuldade, foi associado à contagem de microrganismos, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e contagem de esporos a fim de permitir a identificação e contagem adequada de tais microrganismos.



Figura 5: Amostra de carne apresentando completa deterioração devido à intensa formação de gases e exsudado viscoso e de coloração vermelho escuro a esverdeado.

3.1.1.1 Confirmação das colônias de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* pela técnica de PCR.

Utilizando a técnica de PCR, foi possível detectar a presença de *C. estertheticum* nas colônias obtidas durante a contagem até o 35º dia. Os dados obtidos são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Porcentagem de colônias positivas e respectiva contagem de anaeróbios em amostras de carne inoculadas com esporos de *C. estertheticum* e mantidas a 2°C:

Dias	% colônias positivas	Contagem de anaeróbios
0	N.D*	--
7	80%	3,76
21	80%	5,20
35	60%	4,41
49	N.D	--
63	N.D	--
77	N.D	--
91	N.D	--

* ND: não detectado ** em logUFC/g

Tabela 6: Porcentagem de colônias positivas e respectiva contagem de anaeróbios em amostras de carne inoculadas com esporos de *C. estertheticum* e mantidas a 7°C.

Dias	% colônias positivas	Contagem de anaeróbios
0	N.D	--
7	80%	5,36
21	60%	4,35
35	40%	3,46
49	N.D	--
63	N.D	--
77	N.D	--
91	N.D	--

* ND: não detectado ** em logUFC/g

Foi possível observar que apesar do número de microrganismos anaeróbios aumentar entre os dias 7 e 35 (**Figura 04**), a quantidade de *C. estertheticum* foi decrescendo ao longo do tempo até não ser mais detectada pela técnica de PCR entre as colônias selecionadas (**Tabela 6**). Tal fato pode ter ocorrido provavelmente pelo esgotamento de glicose disponível no meio devido ao crescimento de outros microrganismos, que segundo Yang, Balamurugan e Gill (2009), é um fator limitante ao crescimento de *C. estertheticum*. Em um estudo posterior realizado por estes mesmos pesquisadores, foi observado que a presença de *C. estertheticum* é predominante somente durante os primeiros estágios de desenvolvimento da população microbiana de carnes embaladas a vácuo, pois seu crescimento pode ser inibido pela ausência de glicose, queda do pH (YANG, GILL e BALAMURUGAN, 2009) ou mesmo pela presença de outros microrganismos, como algumas cepas de bactérias ácido lácticas que são capazes de inibir o crescimento de *C. estertheticum*, provavelmente através da produção de bacteriocinas (JONES, et al., 2008).

Embora o crescimento de *C. estertheticum* cesse devido à falta de disponibilidade de glicose, a produção de gás pela fermentação do lactato, de acordo com Yang, Balamurugan e Gill (2009) ainda continua.

Após 35 dias de armazenamento, provavelmente a microbiota predominante da carne embalada a vácuo era composta por outras espécies de microrganismos, o que dificultou a detecção de *C. estertheticum* pelo método adotado.

Para *C. gasigenes*, todas as colônias submetidas à PCR apresentaram um resultado negativo para a amplificação do gene 16S rDNA, não sendo possível estimar a quantidade deste microrganismo presente na carne. Tal fato pode ter ocorrido devido à temperatura ideal de crescimento deste microrganismo (10-15°C), que por ser um pouco elevada, permitiu crescimento mais rápido de outras bactérias (como por exemplo, enterobactérias anaeróbias facultativas), o que pode ter dificultado a seleção das colônias, já que estes outros microrganismos deveriam estar em maior número em relação ao *C. gasigenes*.

3.1.2 Evolução da contagem de esporos nas amostras de carne bovina embalada a vácuo e inoculadas com *C. gasigenes* e *C. estertheticum*.

Os resultados das contagens de esporos encontram-se nas **Tabela 7 e 8**.

Tabela 7: Contagem de esporos (logUFC/g) das amostras de carne inoculadas com *C. gasigenes* e incubadas a 2°C e 7°C:

Tempo (dias)	Controle negativo 2°C	<i>C. gasigenes</i> 2°C	Controle negativo 7°C	<i>C. gasigenes</i> 7°C
7	<2	5,2	<2	4,9
21	<2	<2	<2	<2
35	<2	<2	<2	<2
49	3,8	4,3	<2	4,1
63	<2	4,3	<2	3,2
77	<2	4,1	<2	4
91	<2	4,3	<2	3,8

Tabela 8: Contagem de esporos (logUFC/g) das amostras de carne inoculadas com *C. estertheticum* e incubadas a 2°C e 7°C:

Tempo (dias)	Controle negativo 2°C	<i>C. estertheticum</i> 2°C	Controle negativo 7°C	<i>C. estertheticum</i> 7°C
7	<2	4,52	<2	5,48
21	<2	<2	<2	<2
35	<2	<2	<2	<2
49	<2	3,9	<2	4,2
63	<2	3,9	<2	3
77	<2	3,3	3,0	2,9
91	2,9	3,7	<2	3,1

Comparando-se a evolução da contagem obtida de microrganismos psicrófilos anaeróbios das amostras inoculadas com *C. estertheticum* e *C. gasigenes* armazenadas a 2º e 7ºC (item 3.1.1) com a evolução da contagem de esporos (**Figura 6 e 7**), observou-se que até o 7º dia, a quantidade de esporos e células vegetativas eram muito próximas, provavelmente porque os esporos deveriam estar em processo germinativo. A partir do 21º ao 35º dia, a presença de esporos foi menor que 2 logUFC/g, não sendo possível detectá-los pelo método de contagem em placas. A partir do 49º dia, os esporos voltam a ser detectados e os valores encontrados (log UFC/g) permaneceram em geral, com valores constantes até 91 dias.

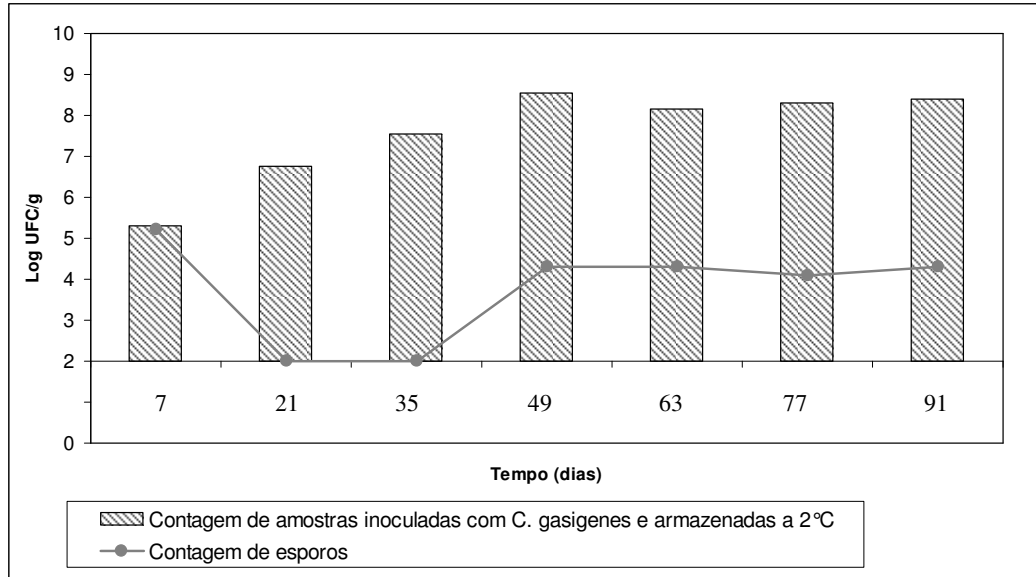


Figura 6: Comparação entre a contagem de microrganismos psicofílicos anaeróbios das amostras inoculadas com *C. gasigenes* e armazenadas a 2°C (item 3.1.1) e contagem de esporos (item 3.1.3).

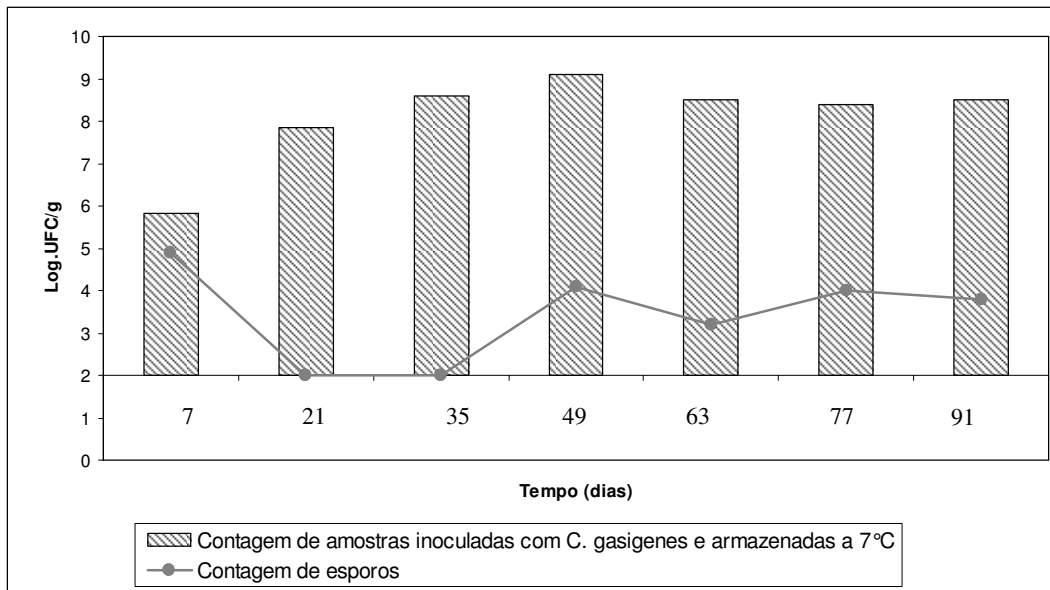


Figura 7: Comparação entre a contagem de microrganismos psicofílicos anaeróbios das amostras inoculadas com *C. gasigenes* e armazenadas a 7°C (item 3.1.1) e contagem de esporos (item 3.1.3).

Nas amostras inoculadas com *C. estertheticum*, armazenadas a 2°C e 7°C a evolução da contagem de microrganismos psicrófilicos anaeróbios e de esporos, apresentaram um perfil semelhante ao descrito para *C. gasigenes* (**Figuras 8 e 9**).

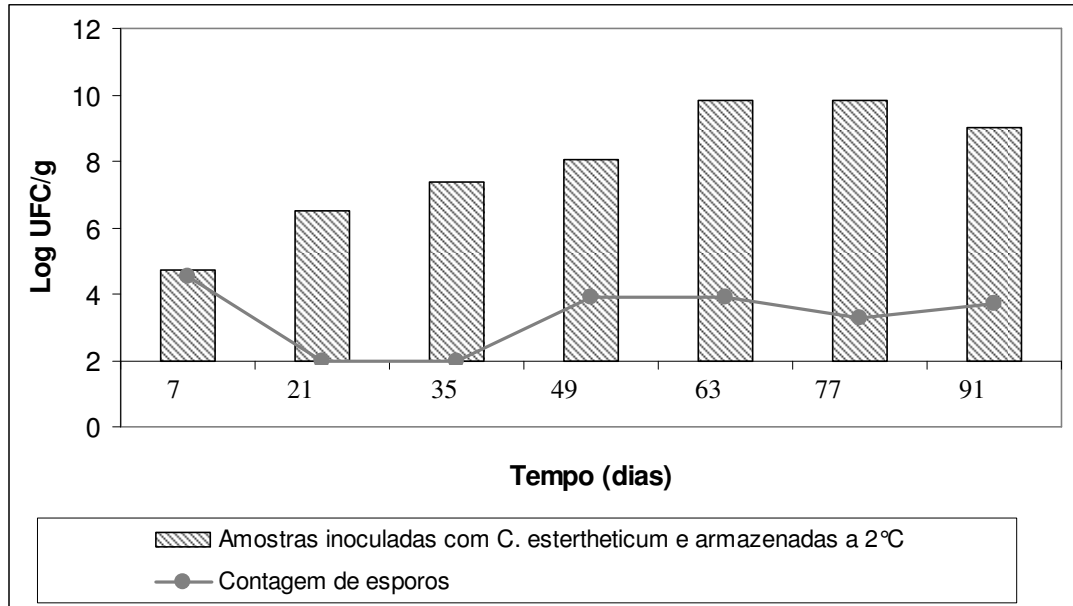


Figura 8: Comparação entre a contagem das amostras inoculadas com *C. estertheticum* e armazenadas a 2°C (item 3.1.1), confirmação de colônias pelo método da PCR (item 3.1.2) e contagem de esporos (item 3.1.3).

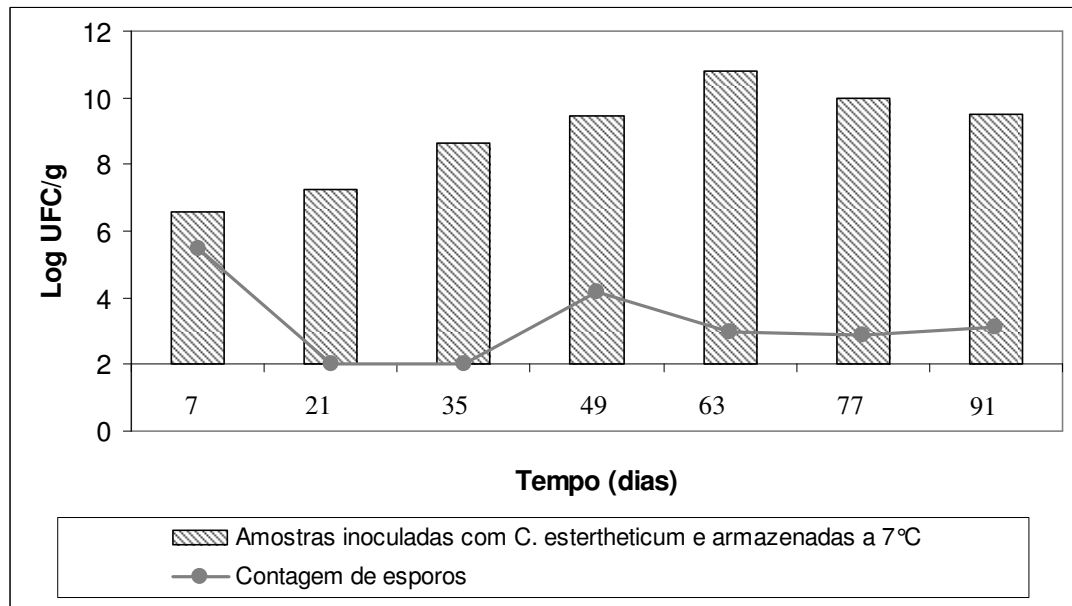


Figura 9: Comparação entre a contagem das amostras inoculadas com *C. estertheticum* e armazenadas a 7°C (item 3.1.1), confirmação de colônias pelo método da PCR (item 3.1.2) e contagem de esporos (item 3.1.3).

Além disso, ao comparar com os resultados do item 3.1.1.1 observou-se que as células vegetativas foram detectadas através da técnica de PCR, somente até o 35º dia em ambas as temperaturas de armazenamento e a contagem de esporos foi observada a partir de 49 dias, sugerindo assim que entre 35 e 49 dias, deve ter ocorrido o início de esporulação dos Clostrídios.

A etapa de esporulação de Clostrídios inicia-se no final da fase exponencial de crescimento. Em geral a privação de nutrientes disponíveis no meio, leva à formação de esporos na maioria dos microrganismos Gram positivos esporulantes, porém no caso de Clostrídios a produção de acetato e butirato, resultantes do metabolismo anaeróbio são os principais responsáveis pela esporulação (DÜRRE e HOLLERGSCHWANDNER, 2004). Tais moléculas se difundem de forma não dissociada, através da membrana citoplasmática, alterando o pH intracelular de bactérias anaeróbias, causando o colapso de proteínas transmembrana e levando os microrganismos à morte, mesmo na presença de nutrientes. Os Clostrídios possuem uma sinalização ainda desconhecida, que detecta a presença destas moléculas e inicia o processo de esporulação (DÜRRE, 2005; ZICKNER, et al., 2003; DÜRRE e HOLLERGSCHWANDNER, 2004).

Desta forma, microrganismos do gênero *Clostridium* mesmo na presença de nutrientes, podem iniciar a formação de esporos se proteínas ácidas específicas forem detectadas no meio.

3.1.2.1 Confirmação das colônias de esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* pela técnica de PCR.

Através da técnica de PCR, foi possível confirmar a presença de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* em todas as colônias selecionadas e analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 2.1.5.1. Assim a contagem de esporos obtida nas **Tabelas 7 e 8** pode ser considerada dos microrganismos em estudo.

A etapa de choque térmico seguida do plaqueamento em ágar PYGS com lisozima foram efetivos na eliminação das células vegetativas e estimulação da germinação de esporos, permitindo a detecção de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

através da técnica da PCR. De acordo com Broda, Delacy e Bell (1998), a probabilidade de se isolar esporos de *Clostridium spp* presentes em uma população de microrganismos é muito maior através da aplicação de tratamento térmico pois esta etapa é capaz de eliminar células vegetativas de outros microrganismos competidores. Além disso a lisozima utilizada para suplementar o ágar PYGS é um dos agentes mais efetivos na germinação cuja ação baseia-se na hidrólise de peptidoglicanos presentes no córtex de esporos (GOULD, 1992).

3.1.3 Avaliação visual das amostras

Os resultados do monitoramento visual das amostras de carnes inoculadas separadamente com *C. gasigenes* e *C. estertheticum* e armazenadas a 2°C e 7°C podem ser observados na **Tabela 9** e **10** e de acordo com as pontuações atribuídas na **Figura 10**.

Tabela 9. Monitoramento visual das amostras de carne inoculadas com *C.gasigenes*, com pontuações atribuídas de acordo com a **Figura 10**.

Tempo de armazenamento (Dias)	2°C*		7°C*	
	<i>C. gasigenes</i>	Controle negativo	<i>C. gasigenes</i>	Controle negativo
0	0	0	0	0
7	0	0	0	0
21	0	0	1-2	0
35	1	0	2-3	0
49	2-3	0	3-4	0
63	3	0	5	1-2
77	4-5	0	5	1-2
91	5	0	5	1-2

*0 - embalagens íntegras, que não apresentaram formação de gases, 1 – embalagens com início de formação de gases, apresentando bolhas, 2 - embalagens com evidência de perda de vácuo, 3 - embalagens com pequeno estufamento, 4 - embalagens estufadas, mas sem distensão, 5 - embalagens completamente estufadas

Tabela 10: Monitoramento visual das amostras de carne inoculadas com *C. estertheticum*, com pontuações atribuídas de acordo com a **Figura 10**.

Tempo de armazenamento (dias)	2°C*		7°C*	
	<i>C. estertheticum</i>	Controle negativo	<i>C. estertheticum</i>	Controle negativo
0	0	0	0	0
7	0	0	0	0
21	0	0	0	0
35	0	0	1-2	0
49	1	0	2-3	0
63	2-3	0	4-5	0
77	4	0	4-5	1
91	4-5	0	5	1-2

* 0 - embalagens íntegras, que não apresentaram formação de gases, 1 – embalagens com início de formação de gases, apresentando bolhas, 2 - embalagens com evidência de perda de vácuo, 3 - embalagens com pequeno estufamento, 4 - embalagens estufadas, mas sem distensão, 5 - embalagens completamente estufadas

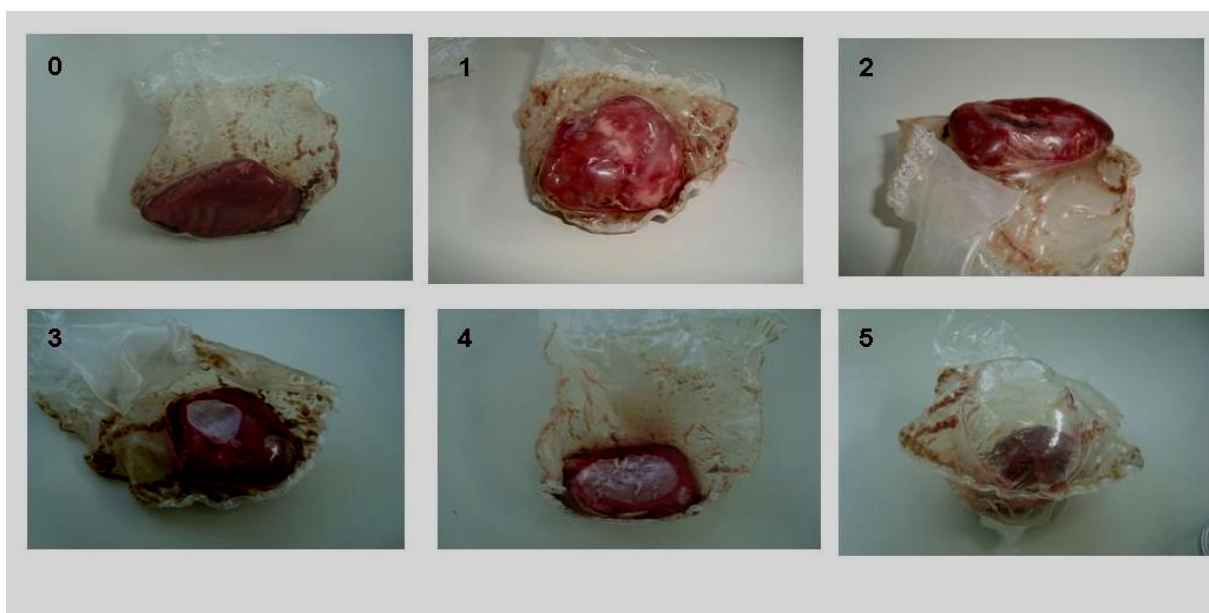


Figura 10: Pontuações atribuídas à análise visual das amostras de carne: 0 - embalagens íntegras, que não apresentaram formação de gases, 1 – embalagens com início de formação de gases, apresentando bolhas, 2 - embalagens com evidência de perda de vácuo, 3 - embalagens com pequeno estufamento, 4 - embalagens estufadas, mas sem distensão, 5 - embalagens completamente estufadas.

Nas amostras inoculadas com *C. gasigenes*, o início da formação de gás, com presença de bolhas, à temperatura de 2°C, foi notado a partir do 35º dia e o estufamento completo da embalagem ocorreu somente no 91º dia. Já nas amostras armazenadas a 7°C, a formação de gases foi mais intensa, sendo possível observar a presença de bolhas no 21º dia. O estufamento por completo foi observado a partir do 63º dia, onde todas as amostras analisadas apresentaram total *blown-pack*. Nenhuma das amostras do controle negativo apresentou início de formação de gases.

Os resultados estão de acordo com os estudos de Moschonas et al. (2009) que ao inocular *C. gasigenes* a concentração inicial de 3 log UFC/g, em amostras de carne embaladas a vácuo, verificaram que o início da formação de gases ocorreram em torno de 35 ± 6 dias quando armazenadas a 1°C e 4°C; além disso, nestas temperaturas, não houve o estufamento por completo durante o período analisado de 100 dias.

A evolução da formação de gases e conseqüente estufamento das embalagens nas amostras inoculadas com esporos de *C. estertheticum*, ocorreu de forma semelhante às aquelas inoculadas com *C. gasigenes*, porém com menor produção de gases, levando um tempo maior para a formação de *blown-pack*. Tal fato foi evidenciado pelo tempo de início da formação de bolhas, que nas amostras que receberam o inóculo de esporos e foram armazenadas a 2°C, ocorreu a partir do 49º dia e para as armazenadas a 7°C, no 35º dia. O estufamento por completo das embalagens, ocorreu somente aos 91 dias.

Todas as amostras controle negativas, de ambos os microrganismos, mantidas a 2°C não apresentaram nenhum indício de formação de bolhas. Já as amostras controle negativas armazenadas a 7°C, apresentaram início de formação de bolhas após 63 dias para *C. gasigenes* e 77 dias para *C. estertheticum*, provavelmente causado por enterobactérias também capazes de produzir gases quando presentes em grande quantidade (BRIGHTWELL, et al., 2007).

Comparando as pontuações da avaliação da formação de *blown pack* (**Tabelas 09 e 10** e **Figura 10**) com as **Figuras 03 e 04** que mostram a contagem de microrganismos anaeróbios psicrófilicos, foi possível verificar que nas amostras

inoculadas com *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes*, o início do estufamento, pontuado como 3 e 4 (**Figura 10**) coincide com o maior índice de contagem de microrganismos que ocorrem por volta de 49-63 dias. Já nos controles negativos (sem inoculação de *Clostridium*), embora os maiores níveis de contagem foram observados após 63 dias, de acordo com as pontuações obtidas na **Figura 10** ocorreram somente formações de pequenas bolhas, sem o estufamento das embalagens. Tal fato confirma a grande capacidade de produção de gás pelas espécies de *Clostridium* estudadas, embora haja a presença de outros microrganismos nos controles negativos, eles não foram capazes de causar o *blown pack* o qual foi observado somente nas amostras inoculadas com os Clostrídios.

Estudos mostram que em geral, quanto maior a temperatura, mais rápida é a formação de gases, além disso, a formação de *blown-pack* está intimamente relacionada ao inóculo inicial de esporos, porém para uma influência significativa, essa diferença deve ser maior que 1 ciclo log acima ou abaixo. (BOEREMA, et al., 2007; MOSCHONAS, et al., 2009). Boerema et al. (2007) demonstrou que carnes embaladas a vácuo, com contaminação inicial menor que 10 esporos por cm² podem produzir gases em menos de 100 dias, quando incubados a 1 °C ou 4 °C. E segundo Moschonas et al. (2009), quando amostras de carne embaladas a vácuo são inoculadas com altas quantidades de esporos (aproximadamente 3 log.UFC/g) mesmo, utilizando uma temperatura de armazenamento de -1,5°C, ocorre a formação de gases em um período de até 42 dias.

Dessa maneira, a melhor forma de se controlar a formação de *blown-pack* em peças de carne embaladas a vácuo é reduzir ao máximo a contaminação superficial em índices abaixo de 10 – 10² UFC/cm² e armazená-las a temperaturas baixas, em torno de -1,5°C.

3.1.4 Medida de pH

Os resultados dos valores de pH obtidos para as amostras inoculadas com *C. gasigenes* podem ser observados na **Figura 11 e Tabela 18**. Analisando a **Figura 11**, nas amostras que foram inoculadas com esporos, o pH foi visivelmente maior em relação às amostras controle negativas, porém só foi observado diferença

significativa ($p < 0,05$) nos períodos finais de avaliação, aos 77 e 91 dias para as embalagens armazenadas a 2°C e 63 a 91 dias para aquelas armazenadas a 7°C.

Além disso, as amostras inoculadas com *C. gasigenes* apresentaram uma tendência à queda até o 35º dia nas amostras armazenadas a 7°C e até o 49º dia para as amostras armazenadas a 2°C. A partir destes dias, os valores de pH apresentaram uma tendência ao aumento. Na amostra armazenada a 2°C, observou-se um grande aumento no valor de pH no 77º dia. Tal fato pode estar associado à grande deterioração e estufamento por completo das embalagens analisadas nesse período.

A curva de pH para as amostras inoculadas com *C. estertheticum* e seus respectivos controles negativos mostraram-se um pouco diferentes em relação à curva de pH de *C. gasigenes*. Analisando a **Figura 12** e **Tabela 19** observou-se o pH das amostras inoculadas apresentaram uma tendência ao aumento, porém seus valores só se tornaram maiores em relação aos seus respectivos controles negativos, após 35 e 63 dias para as amostras armazenadas a 7°C e 2°C respectivamente. Estatisticamente não foi verificada nenhuma diferença ($p < 0,05$) entre as amostras inoculadas e seus controles negativos. Além disso, observou-se que a armazenagem sob diferentes temperaturas não causou nenhuma diferença significativa entre os valores de pH das amostras.

Esta diferença da curva entre controles negativos e amostras inoculadas, onde as amostras que receberam os esporos apresentaram um valor de pH maior em relação às amostras controle negativas em geral, ao longo do período de estocagem pode ter sido provocada pela proteólise decorrente da intensa atividade microbiana (FAROUK; SWAN, 1998), que estava em maior concentração nas amostras que foram inoculadas com esporos, conforme foi observado nas **Figuras 3** e **4**. Outra hipótese é que *C. estertheticum* inicia uma rápida fermentação do lactato após esgotamento da glicose disponível, resultando na redução de ácidos orgânicos do meio, revertendo a queda de pH que ocorre durante a utilização da glicose (YANG, BALAMURUGAN e GILL, 2009).

De acordo com estudos (YANG, GILL e BALAMURUGAN; 2009; YANG, BALAMURUGAN e GILL, 2009), *C. estertheticum* possui um crescimento

exponencial, quando utiliza glicose e glicogênio simultaneamente, e o seu crescimento cessa quando o pH alcança níveis inferiores a 5,5 e a glicose é esgotada do meio.

Avaliando todos os controles negativos das amostras inoculadas com *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, armazenados a 2°C e 7°C, foi possível verificar que houve uma tendência à queda alcançando valores de 5,12 aos 63 dias quando armazenadas a 2°C e 5,01 aos 77 dias quando armazenados a 7°C para *C. gasigenes* e 5,4 aos 77 e 5,29 aos 63 dias respectivamente para 2°C e 7°C nas amostras inoculadas com *C. estertheticum*. Estudos mostram que em temperaturas maiores, o pH é menor, devido ao intenso crescimento microbiano, principalmente de bactérias lácticas e conseqüente produção de ácidos (CAYRÉ, VIGNOLO e GARRO, 2005; NISHI, 2008). Nishi (2008) observou uma sensível queda, variando entre 5,68 a 5,33 para amostras armazenadas a 2°C e de 5,68 a 5,24 em amostras a 7°C.

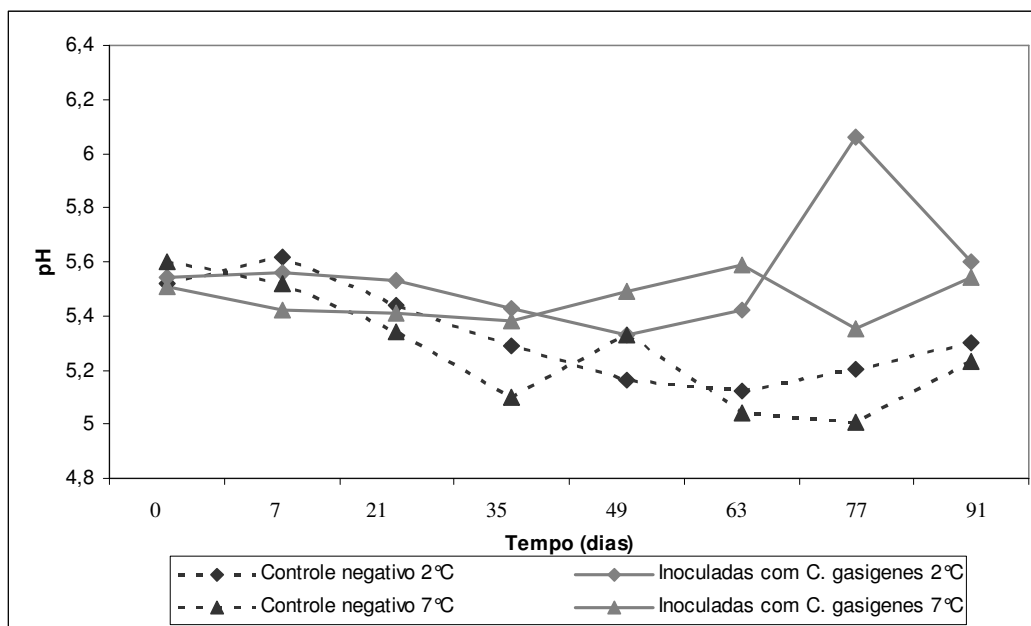


Figura 11: Resultados de pH das amostras de carne inoculadas com esporos de *C. gasigenes* e seus respectivos controles negativos, estocados a 2°C e 7°C.

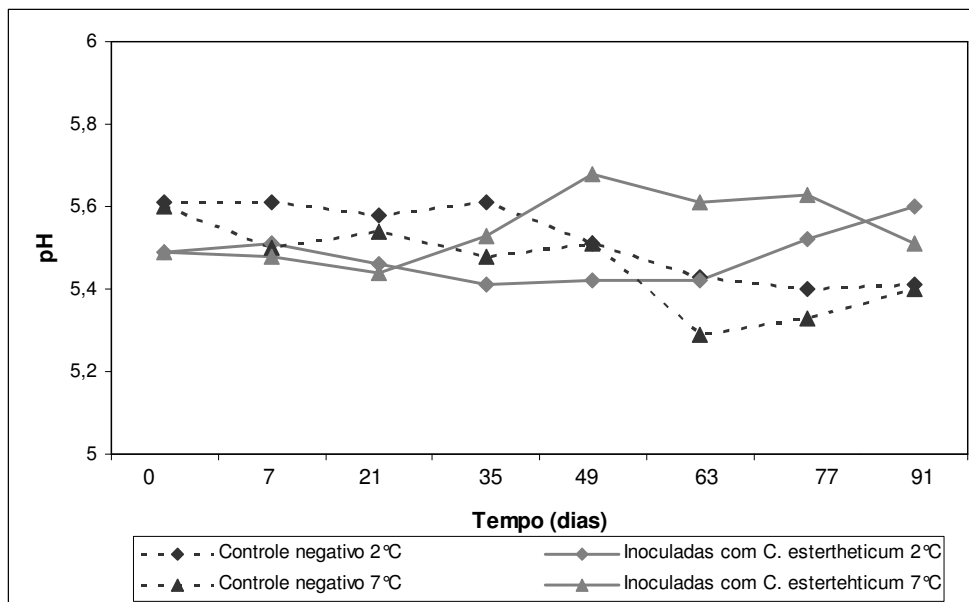


Figura 12: Resultados de pH das amostras de carne inoculadas com esporos de *C. estertheticum* e seus respectivos controles negativos, estocados a 2°C e 7°C.

3.1.5 Avaliação de cor instrumental

Os resultados da avaliação de cor instrumental da superfície das amostras de carne embaladas a vácuo estão ilustrados nas **Figuras 13 e 14**.

A medida da cor foi realizada na superfície da embalagem para verificar a cor na forma de comercialização e se a presença de grande concentração de CO₂ nas amostras que apresentassem *blown-pack* causaria alguma alteração.

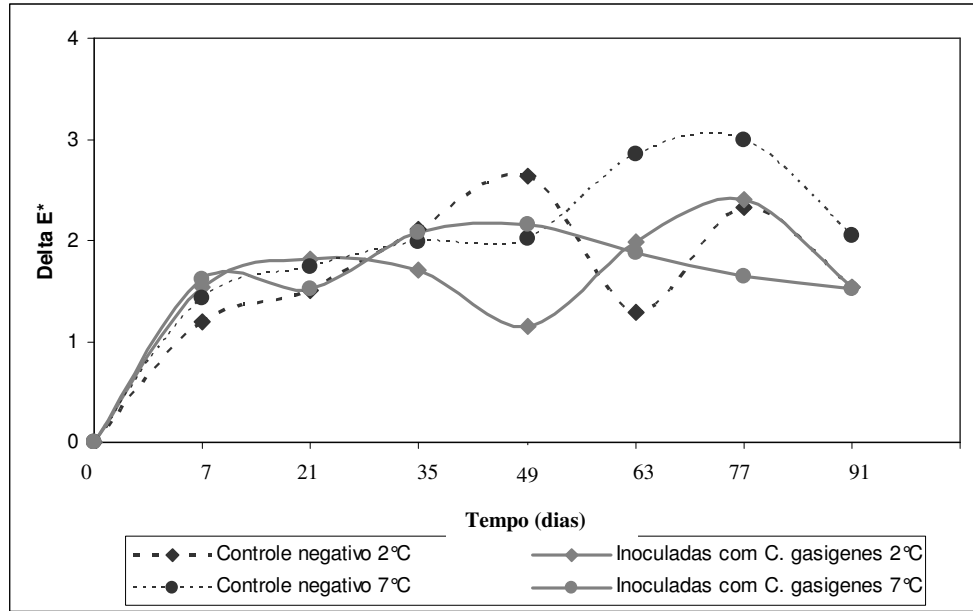


Figura 13: Diferença total de cor da superfície das amostras de carne embaladas a vácuo e inoculadas com esporos de *C. gasigenes* e seus respectivos controles negativos em relação à amostra inicial

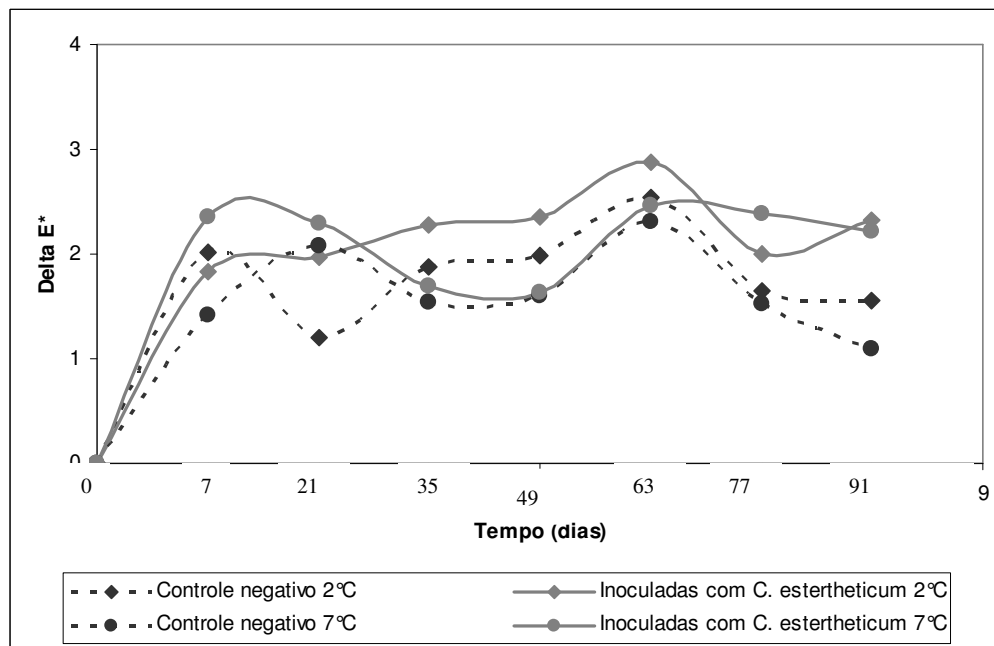


Figura 14: Diferença total de cor da superfície das amostras de carne embaladas a vácuo e inoculadas com esporos de *C. estertheticum* e seus respectivos controles negativos em relação à amostra inicial.

Através das **Figuras 13 e 14**, observa-se que em geral, quanto maior a temperatura de armazenamento, maior o valor de ΔE^* e que as amostras inoculadas com *C. estertheticum* apresentaram maior diferença na cor em relação aos respectivos controles negativos, principalmente no início do período de estocagem. Tal fato pode ter ocorrido devido à presença de oxigênio residual na embalagem, provocando a formação de metamioglobina, que dá uma coloração mais escura à carne, além da formação de exsudato viscoso e de coloração vermelho-esverdeado, presente nas amostras inoculadas com clostrídios. De acordo com Nishi (2008), alguns fatores podem causar a alteração da cor na superfície da carne, tais como a presença de exsudatos, gases, crescimento microbiano e maior produção de CO_2 quando as amostras são armazenadas a temperaturas mais altas.

Ao longo do período de estudo, observou-se a formação de um segundo pico de ΔE^* das amostras inoculadas com *C. estertheticum* e *C. gasigenes* que ocorreu por volta de 49 e 77 dias para *C. estertheticum* em temperaturas de 7°C e 2°C respectivamente e aos 63 dias para *C. gasigenes* em ambas a temperaturas. Tal fato podem ser explicados pela grande concentração de CO_2 nas embalagens distendidas. Avaliando os resultados da avaliação visual obtidos no item 3.1.4, pode-se verificar que os dias em que ocorreram a distensão das embalagens (atingindo as pontuações de 4 a 5), coincidiram com o aumento do ΔE^* : 77 e 49 dias para as amostras inoculadas com *C. gasigenes* armazenadas a 2°C e 7°C respectivamente e 63 dias para *C. estertheticum* armazenado a 2°C e 7°C.

Segundo estudos, o CO_2 ao se dissolver na água, forma íons bicarbonato e prótons que podem causar a diminuição do pH que eleva a oxigenação e a oxidação da mioglobina, causando o escurecimento da carne (PISKE, 1986; JAKOBSEN e BERTELSEN, 2002). Avaliações da composição gasosa em embalagens a vácuo distendidas pela ação de *C. estertheticum* ou *C. gasigenes* mostram que o dióxido de carbono pode ser considerado o gás primário responsável pelo blown-pack de embalagens a vácuo (DAINTY, EDWARDS e HIBBARD, 1989; ROSA, 2009).

3.2 Avaliação *in vitro* da eficiência de ácidos orgânicos sobre esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*.

Acredita-se que *C. estertheticum* e *C. gasigenes* por serem intolerantes à presença de oxigênio, estejam presentes em ambientes de matadouros-frigoríficos na forma de esporos. Por esta razão esporos destes microrganismos foram colocados em contato com os ácidos orgânicos *in vitro*.

Através dos testes realizados, verificou-se que as soluções de ácido acético a 2%, ácido láctico a 2%, e a solução de ácidos contendo 2% de ácido acético, 1% de ácido láctico, 0,25% de ácido cítrico e 0,10% de ácido ascórbico apresentaram baixa eficácia sobre os esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes*. Os fatores de inativação variaram de 1,37 a 1,82 logUFC/mL para *C. estertheticum* e valores um pouco menores para *C. gasigenes* (**Tabelas 11 e 12**). De acordo com a metodologia da União Européia prEN 14347 (WULLT, ODENHOLT e WALDER, 2003) a eficiência esporicida é efetiva quando há redução de aproximadamente 4 logUFC/mL. Neste caso, todos os ácidos orgânicos nos 3 tempos avaliados (5, 15 e 30 minutos) mostraram pouco ou nenhum efeito sobre os microrganismos estudados.

Tabela 11: Fatores de inativação (logUFC/mL) de esporos de *C. estertheticum* por ação dos ácidos orgânicos.

Tempo de contato (min.)	Fator de inativação (log UFC/mL)		
	Solução de Ácidos ^a (Dp) ^b	Ácido Láctico 2% (Dp) ^b	Ácido Acético 2% (Dp) ^b
5	1,57 (± 0,3)	1,84 (± 0,4)	1,61 (± 0,1)
15	1,38 (± 0,4)	1,38 (± 0,3)	1,67 (± 0,2)
30	1,37 (± 0,1)	1,79 (± 0,4)	1,82 (± 0,1)

a .Solução de 2% de ácido acético, 1% de ácido láctico, 0,25% de ácido cítrico e 0,10% de ácido ascórbico.

b . Dp = desvio padrão

Tabela 12: Fatores de inativação (log UFC/mL) de esporos de *C. gasigenes* por ação dos ácidos orgânicos.

Tempo de contato (min.)	Fator de inativação (log UFC/mL)		
	Solução de Ácidos ^a (DP) ^b	Ácido Lático 2% (DP) ^b	Ácido Acético 2% (DP) ^b
5	0,24 (± 0,1)	0,84 (± 0,2)	0,47 (± 0,4)
15	1,36 (± 0,5)	0,24 (± 0,1)	0,15 (± 0,2)
30	0,84 (± 0,2)	0,6 (± 0,1)	0,36 (± 0,2)

a .Solução de 2% de ácido acético, 1% de ácido lático, 0,25% de ácido cítrico e 0,10% de ácido ascórbico.

b . DP = desvio padrão

A aplicação de ácidos orgânicos sobre carne bovina resfriada tem sido avaliada, devido a algumas de suas propriedades tais como: boa atividade bactericida, não há produção de alterações sensoriais significativas no produto final e por serem considerados como aditivos seguros pela FDA.

Estudos realizados por Silva (1995) mostraram que a aplicação de ácidos orgânicos eram capazes de manter baixas as contagens de microrganismos psicrotóxicos durante 15 dias, quando armazenadas a 7°C ± 2°C, sem afetar a aparência das amostras, aumentando em até uma semana a vida de prateleira da carne bovina.

De acordo com Theron e Lues (2007), os ácidos orgânicos são capazes de reduzir, porém não eliminar totalmente microrganismos, devido à capacidade de alguns deles em adquirir mecanismos de resistência contra os ácidos, como uma forma de ultrapassar o suco gástrico do estômago. Alguns patógenos presentes em carnes, como *Escherichia coli* O157:H7 apresentam resistência aos ácidos, enquanto outros como a *Yersinia enterocolitica* são altamente susceptíveis (SMULDERS; GREER, 1998).

Embora algumas cepas possuam mecanismos de resistência aos ambientes ácidos, tais como: alteração da composição da membrana celular, translocação de prótons para o citoplasma celular, causando o aumento do pH intracelular, descarboxilação de alguns aminoácidos como lisina, arginina e glutamato, que consome íons hidrogênio na reação de descarboxilação, controlando o pH do

ambiente, etc (COTTER, HILL, 2003), esses mecanismos não estão presentes na maioria das bactérias Gram positivas. Assim a melhor estratégia adquirida por estes microrganismos ainda é evitar a colonização de ambientes extremamente ácidos (COTTER, HILL, 2003).

Analisando os resultados obtidos, conclui-se que não é eficiente a aplicação destes ácidos em carcaças bovinas resfriadas a fim de inibir a germinação de esporos de *C. gasigenes* e *C. estertheticum* contaminantes da carne, pois os fatores de inativação obtidos foram menores que 4 logUFC/g. Assim torna-se necessário a busca de outros meios para a eliminação destes microrganismos da linha de processamento e conseqüentemente do produto final.

3.3 Formação do biofilme *in vitro* sobre superfície de aço inoxidável

Após as superfícies de aço inoxidável terem sido colocadas em caldo PYGS com as cepas e incubadas a 10°C, foi realizado o monitoramento da formação de biofilme por um período de 30 dias através de contagem em placas e visualização em microscopia eletrônica. O resultado da adesão e formação de biofilme pelas cepas de *C. estertheticum* em função do tempo, através de contagem em placa, estão apresentados na **Tabela 13** e **Figura 15**. O inóculo inicial utilizado foi de 4,6 logUFC/mL para a cepa DSM 8809^T e 4,5 log UFC/ mL para a cepa LHCE-13 de *C. estertheticum* isolada de serra elétrica, ambas cultivadas em caldo PYGS.

Tabela 13: Contagem em placas de *C. estertheticum* aderidos na superfície de cupons de aço inoxidável, ao longo do tempo

Tempo (dias)	Cepas de <i>C. estertheticum</i> log UFC/cm ² * (± Dp)**	
	DSM 8809 ^T	LHCE-13
5	5,6 (±0,3)	5,6 (±0,3)
10	5,2 (± 0,5)	6,2 (±0,4)
15	7,3 (± 0,2)	7,0(±0,3)
20	7,7 (± 0,5)	7,6 (±0,07)
25	8,1 (±0,3)	8 (±0,3)
30	6,6 (±0,07)	5,4 (±0,3)

* média de 3 repetições do experimento ** Desvio Padrão

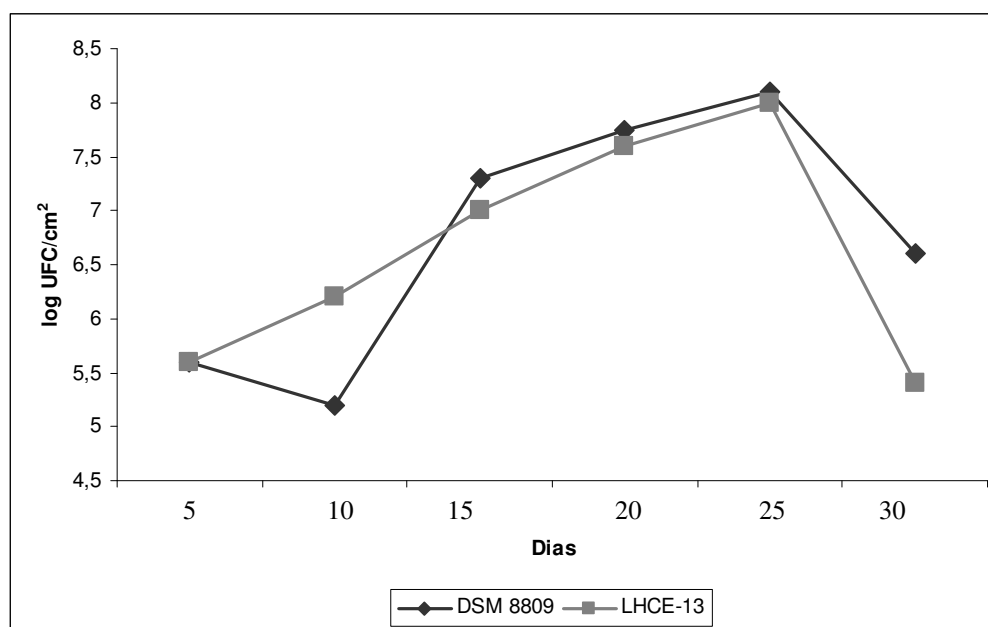


Figura 15: Evolução da formação de biofilme pela cepa DSM 8809^T e LHCE-13 de *C. estertheticum* a 10°C sobre cupons de aço inoxidável

Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que ao longo do tempo de incubação a 10°C, houve um aumento progressivo do número de células aderidas aos cupons. A maior quantidade de células aderidas ocorreu após 25 dias do inóculo inicial, atingindo contagens de 8,1 log UFC/cm² para a cepa padrão e de 8,0 log UFC/cm² para a cepa LHCE-13. No 30º dia, houve uma diminuição do número de

células aderidas das cepas padrão e isolada, para 6,6logUFC/cm² e 5,4log UFC/cm² respectivamente.

Não existe um consenso sobre o número de células bacterianas aderidas necessárias para que se possa considerar como biofilme. Andrade, Bridgeman e Zottola (1998) sugerem que deva haver no mínimo 10⁷ células aderidas/cm², enquanto que Wirtanen, Husmark e Mattila-Sandholm (1996) e Ronner e Wong (1993), consideram como biofilme, 10³ e 10⁵ células aderidas/ cm² respectivamente.

De acordo com esses autores, a média de contagens de células de *C. estertheticum* aderidas aos cupons encontrada no presente trabalho pode ser indícios de capacidade de formação de biofilme por tais microrganismos. Através dos dados obtidos na **Tabela 13**, observou-se que aos 5 dias já havia uma quantidade considerável de microrganismos aderidos à superfície do cupom, com valores de 5,6logUFC/cm² tanto na cepa DSM 8809^T quanto para a cepa LHCE-13 e atingindo valores maiores que 7logUFC/cm² após o 15º dia.

A redução do número de microrganismos em torno do 30º dia pode representar a fase de dispersão de células bacterianas do biofilme. O processo de dispersão de células individuais ou massas celulares faz parte do ciclo de formação do biofilme e é um mecanismo que permite aos microrganismos, colonizar outras áreas, ricas em nutrientes ou outras condições propícias (O'TOOLE, KAPLAN e KOLTER, 2000; STOODLEY et al., 2002)

As pesquisas envolvendo a capacidade de formação de biofilmes por bactérias do gênero *Clostridium* são escassas. Varga, Therit e Melville (2008) relataram pela primeira vez que cepas de *Clostridium perfringens*, eram capazes de formar, sob condições anaeróbias, um biofilme plano com células envoltas por uma densa matriz extracelular, e quando o biofilme formado era exposto a condições aeróbias por até 24 horas, a sobrevivência de *C. perfringens* presente no biofilme era de 76,6%, enquanto que na forma de células planctônicas a sobrevivência à exposição ao oxigênio em um mesmo período de tempo foi de 9,2%.

3.3.1 Observação de formação de biofilme por microscopia eletrônica de varredura

As análises visuais da formação de biofilme em cupons de aço inoxidável em caldo PYGS e incubados a 10°C, através de microscopia eletrônica de varredura foi realizada utilizando-se as ilustrações apresentadas nas **Figuras de 16 a 20**.

Na **Figura 16** pode-se observar, em aumento de 4500X, a superfície limpa, característica do aço inoxidável utilizada nos ensaios de formação de biofilme microbiano. Mesmo com acabamento número 04 nos cupons de aço inoxidável AISI 304 e rugosidade de 0,366 µm com incerteza de 7,3% (ROSADO, 2009), na imagem obtida por micrografia eletrônica observa-se que a superfície de aço inoxidável apresenta microirregularidades.

Jullien et al. (2002) estudando o condição higiênica da superfície de aço inoxidável, após a higienização e a sua relação com a topografia da superfície, propuseram que a presença das irregularidades dificultam a ação da força de cisalhamento durante o processo de higienização, promovendo não só a adesão bacteriana, como também conferindo proteção as células.

Os estágios de adesão e início de formação de biofilmes pela cepa de *C. estertheticum* LHCE-13 isolada de serra elétrica divisora de carcaça (**Figuras de 17 e 18**) e cepa padrão de *C. estertheticum* DSM 8809^T (**Figuras de 19 e 20**) na superfície de aço inoxidável, nos tempos de 5 a 25 dias podem ser observadas.

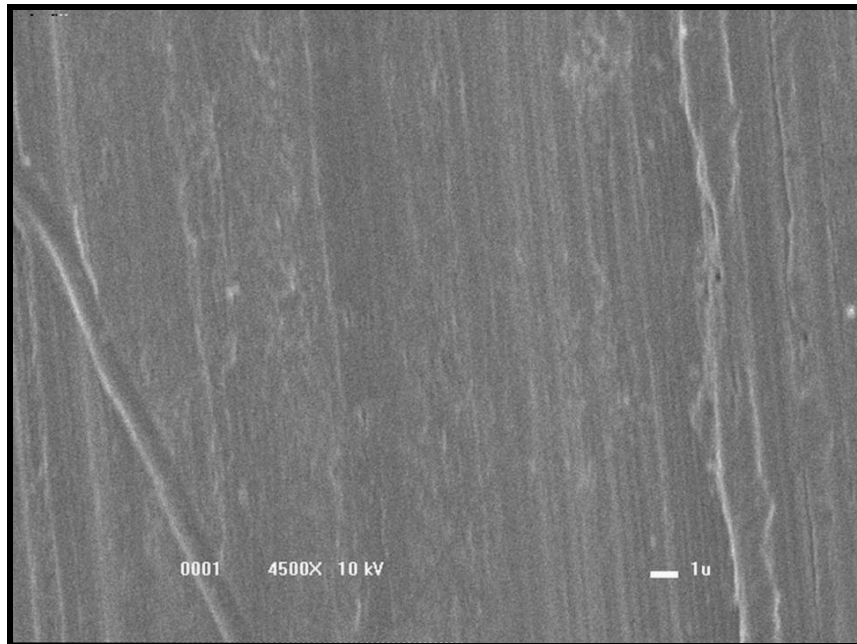


Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície de aço inoxidável em aumento de 4500X.

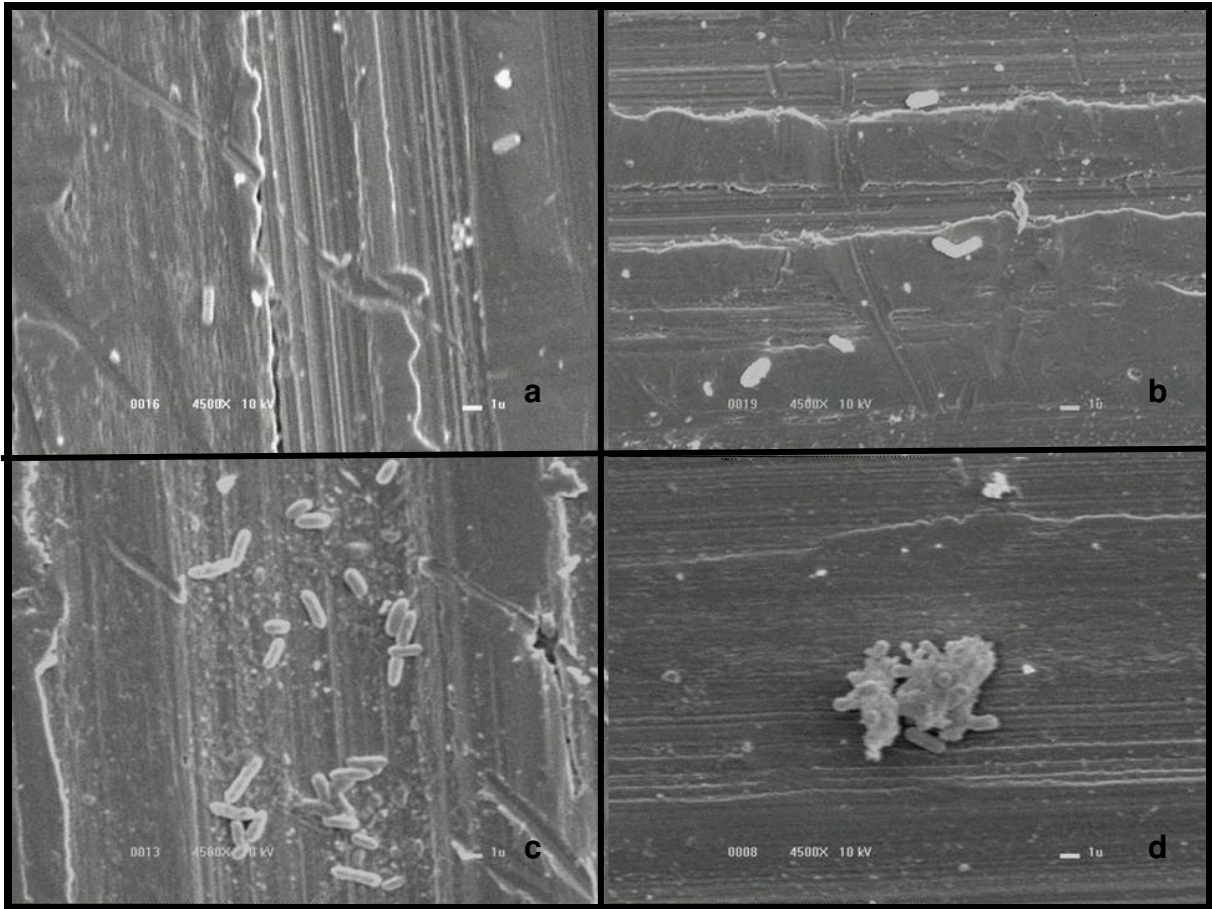


Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável apresentando adesão e formação de biofilme pela cepa isolada de *C. estertheticum* LHCE-13 nos seguintes tempos de incubação: a) 05 dias em aumento de 4500x, b) 10 dias em aumento de 4500x, c) 15 dias em aumento de 4500x e d) 20 dias em aumento de 4500x.

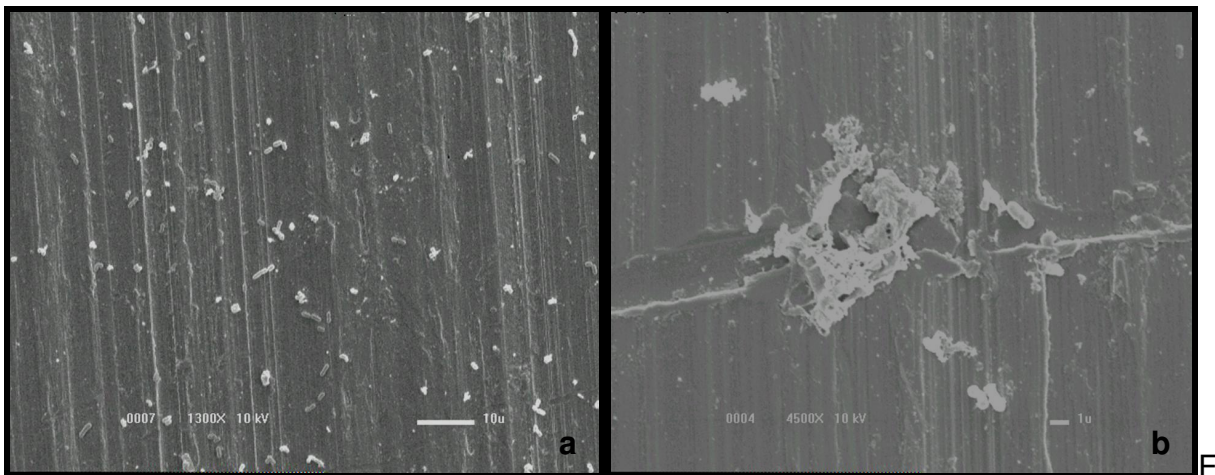


Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável

apresentando formação de biofilme pela cepa de *C. estertheticum* LHCE-13 após 25 dias de incubação: a) em aumento de 1300x e b) em aumento de 4500X.

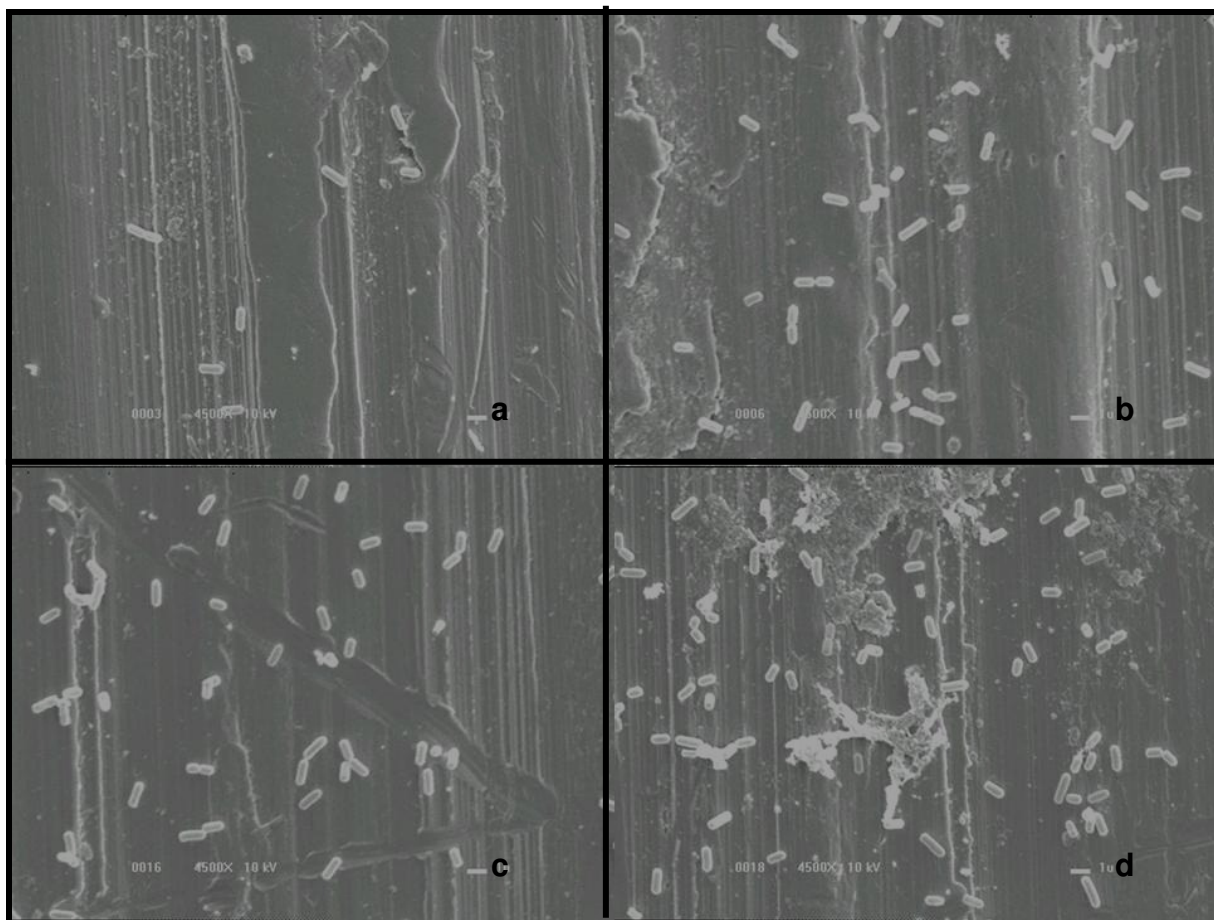


Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável apresentando adesão e formação de biofilme pela cepa padrão de *C. estertheticum* DSM 8809^T, nos seguintes tempos de incubação: a) 05 dias em aumento de 4500x, b) 10 dias em aumento de 4500x, c) 15 dias em aumento de 4500x e d) 20 dias em aumento de 4500x.

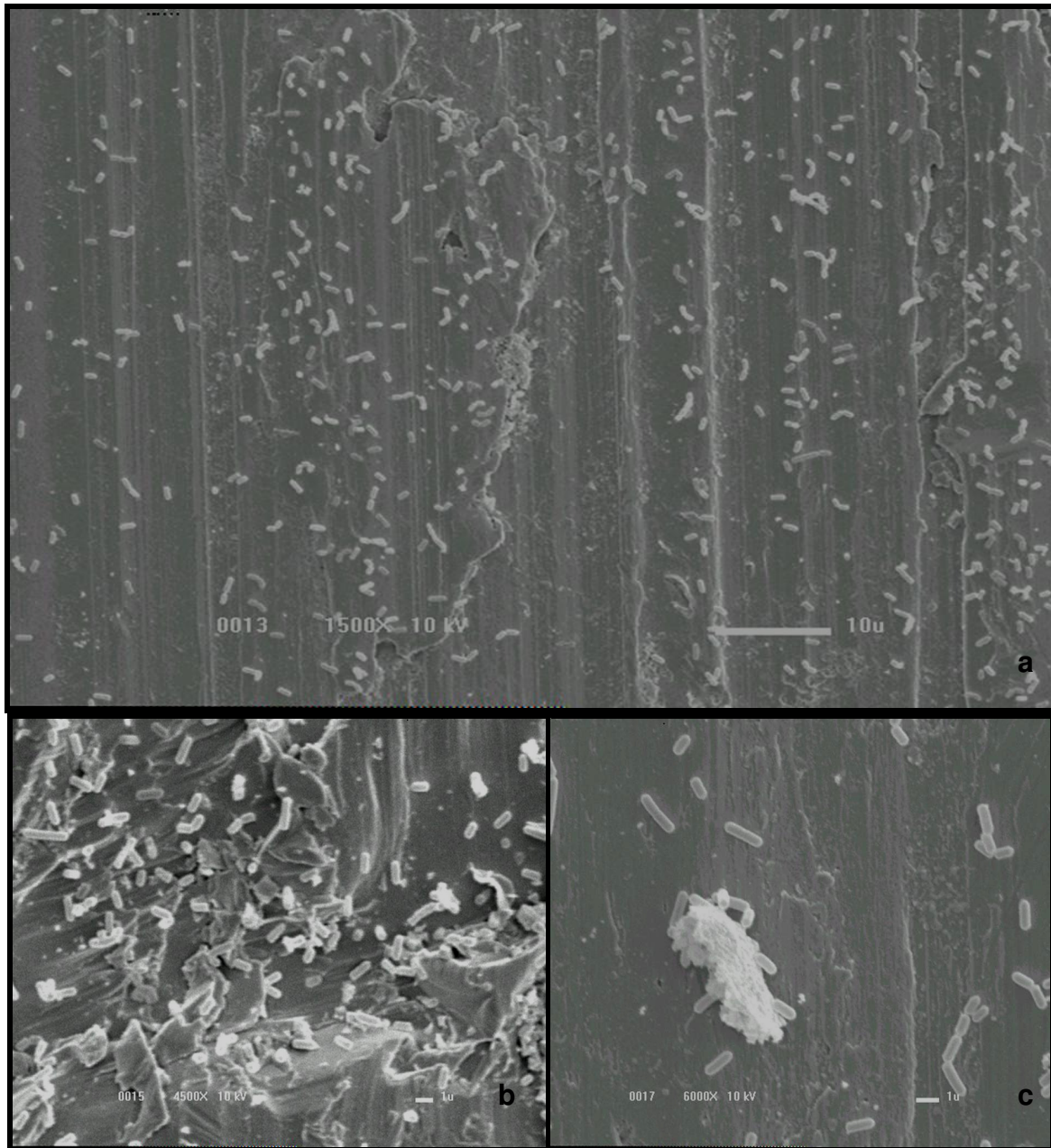


Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM – 5800 LV) da superfície do aço inoxidável apresentando formação de biofilme pela cepa padrão de *C. estertheticum* DSM 8809^T no tempo de incubação de 25 dias, nos seguintes aumentos: a) 1500X, b) 4500x e c) 6000X mostrando a formação de microcolônias.

Nas diferentes imagens obtidas, foi possível notar que a presença de células bacterianas foi maior em regiões que apresentavam irregularidade na superfície do cupom. Na **Figura 20a e b**, tal fato se mostra bem evidente, pois há um grande

acúmulo de células e agregados celulares em uma região que apresenta muitas irregularidades na superfície.

Tanto na cepa DSM 8809^T quanto na isolada LHCE-13, é possível observar a presença de microrganismos aderidos na superfície do aço, e o aumento progressivo do número de células em função do tempo. O início de formação de agregados celulares pode ser observado a partir do 20º dia tanto para a cepa DSM 8809^T (**Figura 19d**) quanto para a cepa isolada LHCE-13 a (**Figura 17d**). Porém a quantidade de células aderidas na cepa padrão (**Figuras 19 e 20**) é visivelmente maior que na cepa isolada (**Figuras 17 e 18**). Observando-se as **Figuras 18 e 20** (cepa isolada e padrão, respectivamente), é possível notar a diferença da quantidade de células aderidas, nos cupons.

As diferenças nos perfis de formação de agregados celulares podem estar associadas provavelmente às diferenças entre as cepas utilizadas no presente trabalho.

Varga, Therit e Melville (2008), observaram diferenças quanto à capacidade de formação de biofilme entre algumas cepas de *Clostridium perfringens*. Este fato foi atribuído à mutação nos genes *pilT* e *pilC* que afetaria a produção de pili na superfície da membrana bacteriana. A ausência destes pilis dificultariam a ancoragem de microrganismos em superfícies sólidas e semi-sólidas, reduzindo assim, a densidade celular em um biofilme. Os autores sugerem ainda a existência de uma complexa rede de regulação, onde a bactéria é capaz de gerenciar a resposta a adotar de acordo com os níveis de carboidratos e escolhendo a via mais vantajosa para a sua sobrevivência. Quando os carboidratos exógenos são limitados, a bactéria pode responder produzindo esporos ou utilizar os pilis para se deslizar e ancorar sobre superfícies.

Analisando as **Figuras 18b e 20c**, é possível verificar a formação de microcolônias, que de acordo com Costerton et al. (1987), representa um estágio de formação de biofilmes, onde as bactérias após de aderirem de forma irreversível, iniciam a fase de multiplicação, dando origem às microcolônias. Assim através do presente estudo é possível afirmar que cepas de *C. estertheticum* são capazes de se aderir à superfície de aço inoxidável e formar biofilmes, cuja estrutura pode promover

sua persistência através da colonização de superfícies de equipamentos, podendo associar-se inclusive com biofilmes de outros microrganismos previamente formados.

3.3.2 Avaliação da eficiência de sanitizantes sobre biofilmes de *C. estertheticum*

O resultado dos ensaios para avaliação da eficiência de sanitizantes sobre os biofilmes de *C. estertheticum* estão apresentados na **Tabela 14 e 15**.

Tabela 14: Efeito de sanitizantes sobre biofilmes da cepa DSM 8809^T de *C. estertheticum*, formados em superfícies de aço inoxidável

Tempo (dias)	Contagem de <i>C. estertheticum</i> DSM 8809 ^T logUFC/cm ^{2*}			
	Controle (Δp)	Ácido peracético 500 mg/L (pH 3,15)	Peróxido de Hidrogênio 200 mg/L (pH 2,79)	Redução
5	5,8 ($\pm 0,4$) ^{**}	<2	<2	> 3,8
10	5,0 ($\pm 0,3$)	<2	<2	> 3,0
15	7,1 ($\pm 0,05$)	<2	<2	> 5,1
20	7,1 ($\pm 0,4$)	<2	<2	> 5,1
25	8,0 ($\pm 0,2$)	<2	<2	> 6,0
30	6,2 ($\pm 0,3$)	<2	<2	> 4,2

* Média de três repetições do experimento; ** cupons sem tratamento; dp= desvio padrão

Tabela 15: Efeito de sanitizantes sobre biofilmes da cepa de *C. estertheticum* isolado nº13, formados em superfícies de aço inoxidável

Tempo (dias)	Contagem de <i>C. estertheticum</i> isolado nº13 logUFC/cm ² *			
	Controle (Δp)	Ácido peracético 500 mg/L (pH 3,15)	Peróxido de Hidrogênio 200 mg/L (pH 2,79)	Redução
5	5,6 (±0,3)**	<2	<2	> 3,6
10	6,2 (±0,4)	<2	<2	> 4,2
15	7,0 (±0,3)	<2	<2	> 5,0
20	7,6 (±0,1)	<2	<2	> 5,6
25	8,0 (±0,3)	<2	<2	> 6,0
30	5,4 (±0,3)	<2	<2	> 3,4

* Média de três repetições do experimento; ** cupons sem tratamento; dp= desvio padrão

Através dos dados obtidos, foi possível observar que tanto o peróxido de hidrogênio, quanto o ácido peracético, quando utilizados na concentração de uso recomendada pelo fabricante e tempo de contato de 10 minutos foram eficientes na redução de células viáveis de biofilmes de *C. estertheticum* em todos os dias de formação (de 05 a 30 dias), na superfície de cupons de aço inoxidável AISI 304 causando uma redução de 3,0 – 6,0 logUFC/cm² para *C. estertheticum* DSM 8809^T e 3,4 - 6,0 logUFC/cm² para *C. estertheticum* cepa nº13.

O ácido peracético e o peróxido de hidrogênio são considerados sanitizantes de amplo espectro, por atuarem como agente bactericida e esporicida e por isso, são amplamente empregados em indústrias de alimentos (RUSSEL, 2001). Alguns estudos comprovam a eficácia destes sobre esporos de *C. estertheticum* e *C. gasigenes* (BRODA, 2007; ROSA, 2009) que se acredita ser a forma prevalente em ambientes de abatedouros-frigoríficos. Nenhum relato de aplicação do uso destes sanitizantes em biofilmes de *C. estertheticum* foi encontrado.

A capacidade de adesão e formação de biofilmes por *C. estertheticum*, constatado no presente trabalho, mostra que este microrganismo pode também formar biofilmes em ambientes de abatedouro-frigorífico nas superfícies dos equipamentos. Apesar dos sanitizantes em estudo mostrarem-se eficazes em

biofilmes de *C. estertheticum*, é necessário lembrar que os biofilmes podem ser desenvolver a partir de um único microrganismo ou de uma comunidade derivada de múltiplas espécies bacterianas (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Estudos mostram que embora o ácido peracético reduza em até 4 ciclos logarítmicos a população bacteriana aderida ao cupom, ele nem sempre é capaz de eliminar totalmente as células associadas ao biofilme (ROSADO, 2009; CABEÇA, 2006). Rosado (2009) observou que o ácido peracético reduziu em 4 ciclos logarítmicos a população de *Enterococcus faecium* associados ao biofilme, porém não eliminou-o totalmente. Resultados similares foram obtidos por Cabeça (2006) ao estudar biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Assim, são necessários programas de higienização eficientes e PPHOs (Procedimentos de Higiene Operacional Padronizado) estabelecidos ao longo da cadeia de produção de carne, para evitar a formação de biofilme, já que uma vez formado, a sua remoção torna-se mais difícil.

4. CONCLUSÕES

1. O desenvolvimento de *C. gasigenes* e *C. estertheticum* em carne bovina embalada a vácuo é favorecido pela elevação da temperatura de estocagem, e conseqüente produção de gás.
2. Ácidos orgânicos mostraram reduzido ou nenhum efeito sobre os esporos de *C. gasigenes* e *C. estertheticum*, não sendo viável sua aplicação em carnes bovinas resfriadas a fim de inibir ou minimizar o *blown pack*.
3. Tanto a cepa de *C. estertheticum* padrão DSM 8809^T quanto a cepa LHCE-13 isolada da serra elétrica divisora de carcaça da linha de processamento da carne bovina embalada a vácuo, foram capazes de formar biofilme a partir de 07 dias de contato com a superfície de aço inoxidável, alcançando contagem máxima aos 25 dias.
4. Os sanitizantes Ácido Peracético e Peróxido de Hidrogênio a 500 mg/L e 200 mg/L respectivamente, quando em contato, durante 10 minutos, com biofilme de *C. estertheticum* formado em superfície de aço inoxidável a 25 dias, mostraram-se eficientes no controle destes biofilmes, promovendo uma redução de contagem maior que 4 logUFC/cm².

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASRI, A.; ROQUES, C.; MICHEL, G.; CABASSUD, C.; APTEL, P. Bacterial properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n.7, p.635-642, 1992.

ANDERSON, M.E.; MARSHALL, R.T. Reducing microbial populations on beef tissues: Concentration and temperature of lactic acid. **Journal of Food Safety**, v.10, n.2, p.181-190, 1990.

ANDRADE, N.J.; BRIDEGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p.833-838, 1998.

ARIAS-MOLIZ, M.T.; FERRER-LUGUE, C.M.; ESPIGARES-RODRIGUEZ, E.; LIEBANA-URENA, J.; ESPIGARES-GARCIA, M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, & Endodontics**. v. 106 n2 p.84-e89, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). Estatísticas 2010. Disponível em: <[http://: www.abiec.com.br](http://www.abiec.com.br)>. Acesso em 06 dez. 2010.

BELL, R.G.; MOORHEAD, S.M.; BRODA, D.M. Influence of heat shrink treatments on the onset of clostridial “blown pack” spoilage of vacuum-packed chilled meat. **Food Research International**. V.34, p.271-275. 2001.

BOEREMA, J.A.; BRODA, D.M e 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.; 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. V.70, n6, p.1434-1439. 2007.

BORGES, J.T.S.; FREITAS, A.S. Aplicação do sistema hazard analysis and critical points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. **B. CEPA**. V.20, n.1. p 01-18. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais

para controle de produtos de origem animal e seus **ingredientes** II. Métodos Físico Químicos. Brasília, 1981.

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.

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. P.336-341. 2007.

BRODA, D.M.; BELL, R.G.; BOEREMA, J.A.; MUSGRAVE, D.R. The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown 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.; DELACY, 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.; DELACY, 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. 1996a.

BRODA, D.M.; DELACY, 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. **Food Microbiology**. V.29. p. 335-352. 1996b.

BRODA, D.M.; MUSGRAVE, D.R.; BELL, R.G. Use of 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.p107-116. 2000.

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, p107-118. 2000.

BYRNE B.; MONAGHAN, A.M.; LYING, J.G.; SHERIDAN, J.J.; BOLTON, D.J. A case of *blown pack* meat linked to *Clostridium estertheticum* in Ireland. **Journal of Food Safety**. v.29, p629-635. 2009.

CABEÇA, T.K. **Susceptibilidade de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente a desinfetantes.** 2006. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas – Microbiologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G. e 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.

CHARACKLIS, W.G., MARSHALL, K.C. Biofilms. **John Wiley** . p. 2552–2555. New York, USA.1990

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

CORLETT Jr., D.A.; BROWN, M.H. PH and acidity. In: Silliker, J. H. **Microbiology of foods**, New York, Academic, v.1, p.92-110. 1980

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; ; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**.v.41, p435-440.1987.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SOCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Annual Reviews of Microbiology**, v.49, p.711-745.1995.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; DeBEER, D.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n.8, p. 2137-2142. 1994.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**.v.67, n.3, p429-453. 2003.

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, p. 473-486. 1989.

DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**. V.73, p. 103-1145.1992.

DAVEY M.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilmes: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p. 847-867. 2000.

DICKSON, J.S., ANDERSON, M.E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing system: a review. **Journal of Food Protection**. V.55(2), p.133-140. 1992.

DÜRRE, P. Sporulation in clostridia (Genetics). *In: Handbook on Clostridia*, DÜRRE, P. Ed. **Taylor & Francis Group**. 920p.2005.

DÜRRE, P., HOLLERGSCHANDNER, C. Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**, v.10, n.02, p. 69-74. 2004.

European Committee for Standardization. *Chemical Disinfectants: Basic Sporicidal Activity—Test Method and Requirements (Phase 1). DRAFT prEN 14347*. Brussels: European Committee for Standardization; 2001.

FAROUK, M.M.; SWAN, J.E. Effect of rigor temperature and frozen storage on functional properties of hot-boned manufacturing beef. **Meat Science**. v.49, p233-247.1998.

FELIPE, L.M. **Associação de Bactérias da Família *Enterobacteriaceae* e *Clostridium estertheticum* com a deterioração “blown pack” em cortes cárneos embalados a vácuo**. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, Universidade Estadual e São Paulo, Jaboticabal, 2008.

FLEMMING, H.C. Biofilms and environmental protection. **Water Science Technology**, v. 27, p.1-10. 1993

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, C.H.; 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 Microbiology**. v.70, n5, p. 372-379. 1991.

GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**. V.43. n.S. p. S99-S109. 1996.

GILL, C.O.; BADONI, M. Effects of peroxyacetic acid acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. **International of Food Microbiology**. V.91, p.43-50, 2004.

GILL, C.O.; JONES, T. The display of retail-packaged beef steaks after their storage in master packs under various atmospheres. **Meat Science**. V.38, n.3. p 385-396. 1994.

GILL, C.O.; PENNEY, N. The effect of the initial gas volume to meat weight ratio on the storage life of chilled beef package under carbon dioxide. **Meat Science**. V.22. p. 53-63. 1988.

GILL, C.O.; PENNEY, N. Penetration of Bacteria into Meat. **Applied and Environmental Microbiology**. v.33 n6. p. 1284-1286. 1977.

GOULD, G.W. Ecosystem Approaches to Food Preservation. **Journal of Applied Bacteriology** (Symp. Suppl.) v. 73 p.58S-68S. 1992.

HOLAH, J. T.; HIGGS, C.; ROBINSON, S.; WORTHINGTON, D.; SPENCELEY, H. A conductance-based surface disinfection test food hygiene. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.255-259, 1990.

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority. **Meat Science**. V.78 .p. 43–52. 2008.

HUNTER, R.C.; BEVERIDGE, T.J. Application of a pH-Sensitive Fluoroprobe (C-SNARF-4) for pH microenvironment analysis in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.5, p 2501-2510.2005.

HUNTER LAB (Hunter Associates Laboratory, Inc.). **User's manual**, versão 1.4. Reston, Virgínia, 1996.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. The use of CO₂ in packaging of fresh red meats and its effect on chemical quality changes in the meat: a review. **Journal of Muscle Foods**, v.13,, p. 143-168, 2002.

JAY, J.M. Microbiologia dos alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**. V.236, n.2, p. 163-73. 2004.

JONES, R.J., HUSSEIN, H.M., ZAGOREE, M., BRIGHTWELL, G., TAGG, J.R. Isolation of lactic bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, v.25, p228-234. 2008

JULLIEN, C.; BÉNÉZECH, T.B.; CARPENTIER, B.; LEBRET, V. ; FAILLE, C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 77-87. 2002.

KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; JOHNSON, M.C. spoilage of vacuum-packaged beef by *Clostridium*. **Journal of Food Protection**. V.52, p. 424-426. 1989.

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

KLAUSEN, M.; GJERMANSEN, M.; KREFT, J.U.; TOLKER-NIELSEN, T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v.261, p.1-11. 2006

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. 1998. Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: a Review. **Int. J. Food. Microbiol.** 42: 9-27.

LEITÃO, M.F.F. Aspectos microbiológicos das carnes. In: CONTRERAS, C.J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. p. 1-5.

LUND, B.; PECK, W. Heat resistance and recovery of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated, processed foods with an extended shelf-life. **Journal Applied Microbiology**, Symp. Suppl. V.76, p. 115-128. 1990

MacLEOD, F.A.; GUIOT, S.R.; COSTERTON, J. W. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.1598–1607.1990.

MARQUES, S. C.; REZENDE, J. G. O. S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.538-543, 2007.

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.

MONDS, R.D.; O'TOOLE, G.A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v.17, n.2, p.73-87.2009.

MOSCHONAS, G.; BOLTON, D.J.; SHERIDAN, J.J.; McDOWELL, D.A. The effect of storage temperature and inoculum level on the time of onset 'blown pack' spoilage. **Journal of Applied Microbiology**. v.108, n.2, p532-539. 2009.

NISHI, L.M. **Efeito da temperatura de estocagem sobre a estabilidade de carne bovina (*M. Gluteus medius*) embalada a vácuo**. 2008. 13 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

NYCHAS, G-J.E, DROSINOS, E.H.; BOARD, R.G. Chemical changes in stored meat. In BOARD, R.G.; DAVIES, A.R (Eds). The Microbiology of Meat and Poultry .London: UK. Blackie Academic and Professional. 1998. p.288 – 326.

OLIVEIRA, F.I.R. ***Clostridium estertheticum* em leite cru e em queijo parmesão e provolone.** 2007. 70f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79. 2000.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, A. S.; SOARES, N. F. F. S.; SILVA, A. M. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 77-83, 2004

PECK, M.W.; FAIRBAIR, D.A.; LUND, B.M. The effect of recovery medium on the estimated heat-inactivation of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. **Letters in Applied Microbiology**. V.15, p.146-151. 1992.

PISKE, D. Effect of oxygen exposure on color stability of ground beef. **Master Science**. Kansas State University, Manhattan, Kansas, 1986, 98p.

POND, M.J.; STONE, D.M.; ALDERMAN, D.J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**.v261, p194-203. 2006.

PRASAI, R.K.; ACUFF, G.R.; LUCIA, L.M.; DALE, D.S.; SAVEL, J.W.; MORGAN, J.B. Microbiological effects of acid decontamination of beef carcasses at various location in processing. **Journal of Food Protection**. v.54, n.11, p.868-872. 1991.

PRICE, D.; WORSFOLD, P.J.; MANTOURA, R.F.C. Hydrogen peroxide in the marine environment: cycling and methods of analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. v.11, p.379-384

RAUECKER, U. N. ***Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* em carne bovina refrigerada, equipamentos e ambiente de matadouros-frigoríficos de diferentes estados brasileiros.** 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, n.9, p. 750-758, 1993.

ROSA, V. P.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. **Identificação de locais de contaminação por *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* em linha**

de processamento de carne bovina embalada à 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, 2007. v. 1. p. 1-4.

ROSA, V.P. **Clostridium estertheticum E Clostridium gasigenes: detecção, isolamento, rastreamento e controle no processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo.** 2009. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ROSADO, M.S. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: modelagem e controle por agentes sanitizantes.** 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

RUSSEL, A.D. Chemical sporicidal and aporostatic agents. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation.** 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1481p.

SAIKI, M.Y. **Ocorrência de toxinas em carne bovina salgada e levemente dessecada, embalada a vácuo e inoculada com *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium botulinum*.** 138f. 1991. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1991.

SAKALA, R.T.; HAYASHIDANI, H.; KATO, Y.; HIRATA, T.; MAKINO, Y.; FUKUSHIMA, A. Change in the composition of the microflora on vaccum packaged beef during chiller storage. **International Journal of Food Microbiology.** V.74, p. 87-99, 2002.

SCHIE, P.M.; FLETCHER, M. Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology,** v.65, n.11, p. 5082-5088. 1999.

SILVA, J.A. Sanitização da carne bovina com ácidos orgânicos. Parte I. **Higiene Alimentar.** V.13, n.60, p.55-62. 1999a.

SILVA, J.A. Sanitização da carne bovina com ácidos orgânicos. Parte II. **Higiene Alimentar.** V.13, n.62, p.37-43. 1999b.

SILVA, J.A.; SOAREZ, L.F.; COSTA, E.L. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão. **Revista Tec Carnes.** v.3, n.1, p.19-26, 2001.

SILVA, J.A. Extensão da vida de prateleira da carne bovina pela utilização de sanitizantes físicos e químicos. 119f. 1995. Tese. (Doutorado em Engenharia de

Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1995.

SMULDERS, F.J.M.; GREER, G.G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: Prospects and controversies. **International Journal of Food Microbiology**.v. 44, n.3, p149-169. 1998.

SOFOS, J.N.; SMITH, G.C. Nonacid meat decontamination technologie: Model studies and commercial applications. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, n.3, p. 171-188. 1998.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v.56, p.187 – 209. 2002.

THERON, M.M.; LUES, J.F.R. Organic acids and meat preservation: A review. **Food Reviews International**. v.23, p123-141. 2007.

TRUPER, H.G.; De'CLARI, L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition'. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 147, p908-909. 1997.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USDA). **GRAS status of acetic acid, ammonium acetate, sodium acetate, and solution diacetate**. Fed. Regist. 47:27813-27814. 1982

VARGA, J.J.; THERIT, B.; MELVILLE, S.B. Type IV Pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the Gram positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 4944- 4951. 2008.

VASCONCELOS, E.C.; ZAPATA, J.F.F.; FIGUEIREDO, E.A.; 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 e Tecnologia de Alimentos**. v.22, n.3, p. 272-277. 2002.

VARGA, J.J.; THERIT, B.; MELVILLE, S.B. Type IV Pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the Gram positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 4944- 4951. 2008.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilmes after rising and cleaning procedures in food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 727-733. 1996.

WORCMAN-BARNINKA, D.; LANDGRAF, M. Microbiologia de carne irradiada. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. p 147.

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.

XAVIER, C.V.A. Métodos combinados utilizados para aumentar a vida útil da carne de frango refrigerada. In In: CONTRERAS, C.J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. p. 1-5.

YANG, X., BALAMURUGAN, S., GILL, C.O. Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium. **Journal of Food Microbiology**, v. 128. p. 501-505. 2009.

YANG, X., GILL, C.O., BALAMURUGAN, S. Effects of temperature and pH on the growth of bacteria isolated from blown packs of vacuum-packaged beef. **Journal of Food Protection**, v. 72, n11, p2380-2385. 2009.

ZICKNER, B. Multiple levels of regulation of solvetogenesis in *Clostridium acetobutylicum*, in *Regulatory Networks in Prokaryotes*. DÜNE, P., FRIEDRICH, B. **Ed. Marcel Dekker Inc**. 187p. New York, 1988.

ZOBELL, C.E. The Effect of Solid Surfaces Upon Bacterial Activity. **Journal of Bacteriology**, v.46, p. 39-56.1943.

APÊNDICE

Resultados microbiológicos

Tabela 16: Resultado das contagem das amostras de carne inoculadas com *Clostridium gasigenes* em log UFC/g:

Tempo (dias)	Estocadas a 2°C		Estocadas a 7°C	
	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i>	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i>
0	2 ^a	2,6 ^b	2 ^a	2,6 ^b
7	4,8 ^a	4,9 ^{ab}	5,85 ^b	5,9 ^{ab}
21	5,6 ^a	6,75 ^b	7,5 ^c	7,85 ^c
35	7,3 ^a	7,55 ^a	8,3 ^b	8,59 ^b
49	7,6 ^a	8,55 ^b	8,75 ^c	9,1 ^d
63	7,78 ^a	8,16 ^a	8,4 ^b	8,5 ^b
77	7,6 ^a	8,3 ^b	8,2 ^b	8,4 ^b
91	7,4 ^a	8,4 ^b	7,9 ^c	8,5 ^b

^{a-c} Valores na mesma linha com diferentes letras subscritas são diferentes (p<0,05)

Tabela 17: Resultado das contagem das amostras de carne inoculadas com *Clostridium estertheticum* em log UFC/g:

Tempo (dias)	Estocadas a 2°C		Estocadas a 7°C	
	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i>	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i>
0	3 ^a	3,6 ^b	3 ^a	3,6 ^b
7	4,3 ^a	4,7 ^a	4,35 ^a	6,7 ^b
21	6,15 ^a	6,5 ^a	6,1 ^a	7,25 ^b
35	6,83 ^a	7,35 ^a	8,5 ^a	8,65 ^a
49	7,3 ^a	8,05 ^a	8,9 ^a	9,45 ^a
63	9,6 ^a	9,85 ^a	10,4 ^b	10,8 ^b
77	9,15 ^a	9,65 ^b	9,48 ^b	10 ^b
91	8,2 ^a	9 ^b	9,2 ^b	9,5 ^b

^{a-c} Valores na mesma linha com diferentes letras subscritas são diferentes (p<0,05)

Resultados físicos-químicos

Tabela 18: Valores de pH das amostras de carne inoculadas com *C. gasigenes*:

Tempo (dias)	Estocadas a 2°C		Estocadas a 7°C	
	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i>	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i>
0	5,52 ^a	5,54 ^a	5,6 ^a	5,51 ^a
7	5,64 ^a	5,56 ^a	5,52 ^b	5,42 ^b
21	5,44 ^a	5,53 ^b	5,34 ^c	5,41 ^{bc}
35	5,29 ^a	5,43 ^a	5,10 ^a	5,38 ^a
49	5,16 ^a	5,33 ^a	5,33 ^a	5,49 ^a
63	5,12 ^a	5,42 ^a	5,04 ^b	5,59 ^a
77	5,2 ^a	6,06 ^b	5,01 ^c	5,35 ^a
91	5,3 ^a	5,6 ^b	5,23 ^a	5,54 ^b

^{a-c} Valores na mesma linha com diferentes letras subscritas são diferentes ($p < 0,05$)

Tabela 19: Valores de pH das amostras de carne inoculadas com *C. estertheticum*:

Tempo (dias)	Estocadas a 2°C		Estocadas a 7°C	
	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i>	Controle negativo	Amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i>
0	5,61 ^a	5,49 ^a	5,6 ^a	5,49 ^a
7	5,61 ^a	5,51 ^a	5,5 ^a	5,48 ^b
21	5,58 ^a	5,46 ^a	5,94 ^a	5,44 ^a
35	5,61 ^a	5,41 ^a	5,48 ^a	5,53 ^a
49	5,51 ^a	5,42 ^a	5,51 ^a	5,68 ^a
63	5,43 ^a	5,42 ^a	5,29 ^a	5,61 ^a
77	5,4 ^a	5,52 ^a	5,33 ^a	5,63 ^a
91	5,41 ^a	5,6 ^a	5,4 ^a	5,51 ^a

^{a-b} Valores na mesma linha com diferentes letras subscritas são diferentes ($p < 0,05$)

Tabela 20: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com *C. gasigenes* e estocadas a 2°C:

Tempo (dias)	Controle negativo				Amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i>			
	L*	a*	b*	Delta E	L*	a*	b*	Delta E
0	39,02 ^a	10,15 ^a	7,55 ^a	0	40,05 ^a	10,15 ^a	8,32 ^a	0
7	38,85 ^a	10,88 ^a	7,82 ^{ab}	1,2	39,79 ^a	10,88 ^a	9,17 ^a	1,54
21	40,46 ^{ab}	9,49 ^a	8,27 ^{ab}	1,5	41,07 ^a	9,49 ^a	8,43 ^a	1,82
35	40,72 ^{ab}	9,61 ^a	8,38 ^{ab}	2,11	41,84 ^a	9,61 ^a	9,13 ^a	1,71
49	40,31 ^{ab}	10,25 ^a	8,23 ^{ab}	2,64	42,88 ^a	10,25 ^a	9,5 ^a	1,14
63	42,77 ^b	9,88 ^a	8,71 ^{ab}	1,29	43,03 ^a	9,88 ^a	9,04 ^a	1,98
77	41,03 ^{ab}	9,73 ^a	9,09 ^b	2,32	41,91 ^a	9,73 ^a	8,33 ^a	2,41
91	39,81 ^{ab}	10,46 ^a	7,70 ^{ab}	1,53	39, ^a	10,46 ^a	7,96 ^a	1,53

^{a-b} Valores na mesma coluna com diferentes letras subscritas são diferentes (p<0,05)

Tabela 21: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com *C. gasigenes* e estocadas a 7°C:

Tempo (dias)	Controle negativo				Amostras inoculadas com <i>C. gasigenes</i>			
	L*	a*	b*	Delta E	L*	a*	b*	Delta E
0	38,65 ^a	9,62 ^a	7,39 ^a	0	40,25 ^a	9,64 ^a	8,23 ^a	0
7	39,35 ^a	10,38 ^a	8,03 ^{ab}	1,42	41,86 ^a	9,98 ^a	8,71 ^a	1,62
21	40,48 ^a	10,15 ^a	8,17 ^{ab}	1,74	41,60 ^a	10,65 ^a	8,55 ^a	1,52
35	40,98 ^{ab}	10,49 ^{ab}	8,44 ^{ab}	1,99	42,64 ^a	10,74 ^a	9,06 ^a	2,07
49	40,51 ^{ab}	10,47 ^{ab}	8,56 ^{ab}	2,01	42,05 ^a	10,73 ^a	9,02 ^a	2,15
63	42,28 ^{ab}	11,91 ^{ab}	9,26 ^b	2,86	41,68 ^a	10,15 ^a	9,09 ^a	1,87
77	42,21 ^b	13,20 ^b	9,81 ^b	3,0	41,51 ^a	11,39 ^a	8,77 ^a	1,65
91	39,85 ^a	11,22 ^{ab}	8,79 ^{ab}	2,04	41,24 ^a	10,42 ^a	8,59 ^a	1,52

^{a-b} Valores na mesma coluna com diferentes letras subscritas são diferentes (p<0,05)

Tabela 22: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com *C. estertheticum* e estocadas a 2 °C:

Tempo (dias)	Controle negativo				Amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i>			
	L*	a*	b*	Delta E	L*	a*	b*	Delta E
0	37,21 ^a	9,49 ^a	6,84 ^a	0	38,35 ^a	9,45 ^a	6,94 ^a	0
7	37,61 ^a	10,01 ^a	7,26 ^a	2,02	38,88 ^a	10,36 ^a	8,03 ^a	1,83
21	36,21 ^a	9,91 ^a	6,88 ^a	1,20	39,25 ^a	10,52 ^a	8,47 ^a	1,97
35	38,63 ^a	9,83 ^a	7,43 ^a	1,87	40,88 ^a	10,1 ^a	8,34 ^a	2,27
49	38,64 ^a	9,18 ^a	7,63 ^a	1,99	40,02 ^a	10,73 ^a	8,61 ^a	2,35
63	38,62 ^a	10,42 ^a	8,19 ^a	2,54	40,53 ^a	11,41 ^a	9,36 ^a	2,88
77	37,04 ^a	9,98 ^a	6,72 ^a	1,65	40,05 ^a	9,92 ^a	8,16 ^a	2,00
91	37,83 ^a	9,91 ^a	7,30 ^a	1,56	40,83 ^a	10,70 ^a	8,78 ^a	2,32

^{a-b} Valores na mesma coluna com diferentes letras subscritas são diferentes (p<0,05)

Tabela 23: Valores de cor instrumental das amostras de carne inoculadas com *C. estertheticum* e estocadas a 7 °C:

Tempo (dias)	Controle negativo				Amostras inoculadas com <i>C. estertheticum</i>			
	L*	a*	b*	Delta E	L*	a*	b*	Delta E
0	38,44 ^a	10,26 ^a	7,52 ^a	0	40,97 ^a	9,11 ^a	7,75 ^a	0
7	39,25 ^a	10,10 ^a	7,51 ^a	1,41	39,22 ^a	9,88 ^a	7,46 ^a	2,36
21	40,67 ^a	10,44 ^a	8,71 ^a	2,08	38,35 ^a	9,67 ^a	7,53 ^a	2,3
35	38,54 ^a	8,98 ^a	7,04 ^a	1,54	41,60 ^a	10,4 ^{ab}	8,98 ^a	1,69
49	37,92 ^a	10,45 ^a	7,28 ^a	1,6	41,44 ^a	9,90 ^a	8,67 ^a	1,63
63	38,50 ^a	10,48 ^a	7,77 ^a	2,31	39,99 ^a	12,12 ^b	9,56 ^a	2,46
77	37,55 ^a	11,20 ^a	7,45 ^a	1,53	41,32 ^a	11,34 ^b	9,65 ^a	2,38
91	37,84 ^a	10,15 ^a	7,28 ^a	1,1	41,16 ^a	10,72 ^b	9,71 ^a	2,21

^{a-b} Valores na mesma coluna com diferentes letras subscritas são diferentes (p<0,05)

Resultado do teste de ácidos orgânicos

Tabela 24: Resultado das contagens em log UFC/g após exposição dos ensaios de ácidos orgânicos sobre esporos de *C. gasigenes*:

Tempo de exposição (minutos)	Solução de ácidos	Ácido láctico	Ácido acético
5	5,05	4,78	5,01
15	5,24	5,24	4,95
30	5,25	4,83	4,08

Tabela 25: Resultado das contagens em log UFC/g após exposição dos ensaios de ácidos orgânicos sobre esporos de *C. estertheticum*:

Tempo de exposição (minutos)	Solução de ácidos	Ácido láctico	Ácido acético
5	4,6	4,0	4,37
15	3,48	4,6	4,69
30	4,0	4,24	4,48