

## **DETECÇÃO DE *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* INCRIMINADOS NA DETERIORAÇÃO DE CARNES BOVINAS REFRIGERADAS EMBALADAS A VÁCUO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR**

**RAUECKER**, Ursula Nunes<sup>1</sup>; **DEL'ACQUA**, Tiago Vilela<sup>2</sup>; **MESQUITA**, Adriano Queiroz de<sup>2</sup>; **NUNES**, Iolanda Aparecida<sup>3</sup>; **MESQUITA**, Albenones José de<sup>4</sup>

Palavras chave: Estufamento de embalagem, carne bovina, deterioração

### **1. INTRODUÇÃO**

A indústria cárnea passa por um momento de reestruturação, objetivando comportar não só o crescimento de demanda, mas atender aspectos de qualidade cada vez mais severamente exigidos pelo mercado importador. A questão da segurança dos alimentos tem sido tema pertinente não apenas de estudos científicos, como também nas questões de ordem político-econômica dos países de todo o mundo, sendo o principal fator limitante das exportações de produtos cárneos brasileiros.

Tendo em vista a relevância econômica do comércio internacional de carnes para nosso país, destaca-se um dos problemas de ocorrência nacional de maior destaque enfrentado atualmente pelas indústrias de carne e derivados, o estufamento (ou tufamento) de embalagem de carnes refrigeradas à vácuo.

Este problema é causado pela contaminação da carne, durante o fluxograma de produção, por microrganismos deteriorantes, produtores de gás, conferindo aos produtos características repugnantes. Falhas operacionais, desrespeito a capacidade máxima diária de abate e conseqüente abuso de temperatura são os principais fatores relacionados à ocorrência desse fenômeno.

Os clostrídios psicrófilicos e psicrotróficos são os principais determinantes de estufamento de carne bovina embaladas a vácuo e geralmente são isolados do solo, fezes bovinas, efluentes, batatas e leite, destacando-se duas espécies incriminadas na deterioração de carnes embaladas a vácuo: *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* (BRODA et al., 1998).

Pouco se conhece sobre esses microrganismos, mas sabe-se que pertencem a um grupo de clostrídios psicrófilicos associados à carne, não produtores de toxinas que deterioram a carne refrigerada embalada a vácuo em aproximadamente quatro semanas. A embalagem torna-se distendida pela presença de gases como o hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio, ésteres butíricos, butanol, gás sulfídrico, e outros compostos sulfurados (BRODA et al., 1998).

Estudos mais detalhados sobre a distribuição ambiental desses microrganismos, sobre sua colonização nas plantas dos matadouros-frigoríficos e o monitoramento da efetividade das medidas corretivas através da técnica de PCR são fundamentais para o controle do agentes nas indústrias de processamento de carne.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Amostragem

Para a escolha dos estabelecimentos de abate, foram adotados os seguintes critérios: ser habilitado para realizar comércio internacional, estar incluído na lista geral de exportação e ter experimentado incidente de estufamento de embalagem de carne refrigerada embalada a vácuo.

Foram colhidas 935 amostras de matadouros-frigoríficos localizados em Goiás, São Paulo e Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Pará, Minas Gerais e Bahia. Destas, 230 de superfície de meias carcaça, 193 de cortes cárneos resfriados embalados a vácuo, 131 de ralos da desossa, 63 de roletes de ralos da desossa, 75 de superfície de esteiras da desossa e 243 de ambiente e equipamentos de câmaras frias.

Para a colheita das amostras de superfícies foram utilizados “swabs” umedecidos em solução salina 0,85%, realizando-se esfregaços em áreas correspondentes a 100 cm<sup>2</sup> ou 10 cm<sup>2</sup>, em função da superfície disponível para colheita. As amostras foram identificadas com etiquetas adesivas, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo em escamas e encaminhadas ao laboratório do Centro em Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária - UFG. As carnes embaladas a vácuo foram igualmente encaminhadas em caixas isotérmicas, observando-se a integridade física das embalagens e a manutenção de baixas temperaturas dos cortes cárneos.

### 2.2 Preparo das amostras e extração do DNA genômico

A extração foi conduzida de acordo com a metodologia proposta por van SOOLINGEN et al. (1991), com algumas modificações.

Para a avaliação da integridade e a determinação da concentração do DNA obtido, 2 µL da solução de DNA de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (0,5X), com duração da corrida de aproximadamente quarenta minutos a 90 volts (V). O gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo e observado em transluminador de luz ultravioleta. De cada gel foi feito registro fotográfico, utilizando-se câmera fotográfica digital.

Foram utilizados para a reação de amplificação apenas o DNA cujos fragmentos foram visualizados como faixas compactas na parte superior do gel. A concentração do DNA foi estimada através de comparação visual com diluições conhecidas do DNA padrão de fago λ.

### 2.3 Técnica de PCR

Foram selecionados dois pares de iniciadores para o *Clostridium estertheticum* (HELPS et al., 1999 e BRODA et al, 2003) e um par para o *Clostridium gasigenes* (BRODA et al., 2003). Com o primeiro par de iniciadores para o *Clostridium estertheticum*, *Revised forward primer* e *Revised reverse primer*, (HELPS et al., 1999) obteve-se fragmento de 641 pares de base (pb). Com o segundo par, 16SEF/16SER, (BRODA et al., 2003), obteve-se um produto de 790 pb. Com o par de iniciadores para o *Clostridium gasigenes* 16SDBF/16SDBR, espera-se obter um *amplicon* de 935 pb (Quadro 1). As concentrações finais das soluções que compõem as misturas e as condições das reações encontram-se especificadas nos Quadros 2 e 3.

QUADRO 1- Sequência de bases de iniciadores para *C. estertheticum* e *C. gasigenes*

Pares de iniciadores	Sequência de bases
Revised forward primer ( <i>C. estertheticum</i> )	5' TGATCGCATGATCTTAACATCAAAG 3'
Revised reverse primer ( <i>C. estertheticum</i> )	5' TCGACCCCGACACCTAGTATT 3'
16SEF ( <i>C. estertheticum</i> )	5' -TCGGAATTTCACTTTGAG - 3'
16SER ( <i>C. estertheticum</i> )	5'-AAGGACTTCACTCATCTCTG -3'
16SDBF ( <i>C. gasigenes</i> )	5'- GAGAGGAGTTCTTCGGAACGA- 3'
16SDBR ( <i>C. gasigenes</i> )	5'-AAGCSACTTCCCCAATTAC -3'

QUADRO 2- Misturas das reações de PCR e concentrações finais dos reagentes, segundo os pares de iniciadores utilizados

Reagentes	Pares de iniciadores		
	Reverse/Forward	16SEF/16SER	16SDBF/16SDBR
Referência	HELPS et al (1999)	BRODA et al (2003)	BRODA et al (2003)
Amplicon	641 pb	790 pb	935 pb
Solução de DNA (100 ng/5µL)	5µl	5µl	5µl
Iniciador	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM
DNTP	0,2mM	0,2mM	0,5mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	1,5mM	1,5mM
Taq DNA polimerase	1U	1U	1U
<b>Volume total</b>	50µL	50µL	50µL

QUADRO 3 - Condições das reações de PCR para *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes* segundo os pares de iniciadores de oligonucleotídeos

Protocolo	Reverse/Forward	Reverse/Forward	Reverse/Forward
Referência	HELPS et al (1999)	BRODA et al (2003)	BRODA et al (2003)
Tamanho do fragmento	641 pb	790 pb	935 pb
Desnaturação inicial	94°C/5min	94°C/5 min	94°C/5min
Ciclos:	40	40	45
Desnaturação	94°C/1min	94°C/1min	94°C/1min
Anelamento	60°C/1min	60°C/1min	60°C/1min
Extensão	72°C/1min	72°C/1min	72°C/1min
Extensão Final	72°C/10min	72°C/10min	72°C/10min
Gel de Agarose	1%	1%	1%
Voltagem de corrida	110 V	120 V	135 V

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta dos resultados de PCR de 935 amostras procedentes de Matadouros-Frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal permanente de oito Estados da Federação. Até o momento as amostras foram

submetidas a amplificação com o primeiro par de primers para *Clostridium estertheticum*, *Revised forward primer* e *Revised reverse primer*, (HELPS et al., 1999). Foram obtidas 149/935 (15,94%) amostras positivas para *C. estertheticum* no total da amostragem e 786/935 (84,06%) negativas.

Considerando a fonte de detecção, foram verificadas 27/230 (11,7%) e 27/193 (14%) amostras positivas de superfície de meias-carcaças e cortes comerciais, respectivamente, enquanto que 203/230 (88,3%) e 166/193 (86%) foram negativas, respectivamente, na mesma ordem.

Para as amostras de ambiente de desossa verificou-se a presença de *C. estertheticum* em 24/131 amostras de ralos da desossa (18,3%), 12/63 (19%) e 09/75 (12%) nas amostras de rolete da esteira da desossa e superfície da esteira da desossa, respectivamente. Em 50/243 (20,6%) amostras de ambiente e equipamentos de câmara fria foi detectada presença de *C. estertheticum* e 193/243 (79,4%) foram negativas.

TABELA 1. Distribuição de *C. estertheticum*, segundo as fontes de detecção

AMOSTRA	<i>C. estertheticum</i> (PCR)			
	POSITIVAS		NEGATIVAS	
	N.	%	N.	%
Superfície de meias-carcaças	27/230	11,7	203/230	88,3
Cortes comerciais	27/193	14,0	166/193	86,0
Ralo da desossa	24/131	18,3	107/131	81,7
Rolete da esteira da desossa	12/63	19,0	51/63	81,0
Esteira da desossa	09/75	12,0	66/75	88,0
Swabs de ambiente e equipamentos de câmaras frias	50/243	20,6	193/243	79,4
<b>Total</b>	149/935	15,94	786/935	84,06

Os maiores índices de positividade foram obtidos nas amostras provenientes das câmaras frias e sala da desossa, destacando-se ralos e roletes de esteiras. Esses resultados indicam falhas de higienização desses pontos, visto que são de difícil acesso. O acúmulo de matéria orgânica associado às baixas temperaturas desses ambientes, nunca superiores a 10°C (PARDI et al., 2001), favorecem o desenvolvimento e disseminação do microrganismo na planta dos estabelecimentos de abate e processamento de carnes.

Além disso, deve-se destacar a resistência do microrganismo frente aos sanitizantes usualmente adotados na higienização das indústrias. A escolha de substâncias esporicidas, assim como a determinação de concentrações eficiente de uso são fundamentais no controle do agente, uma vez detectado na indústria.

No presente trabalho, foram obtidos índices de positividade superiores em cortes cárneos, comparadamente aos verificados em *swabs* de superfície de meias-carcaças, indicando claramente o aumento da contaminação após o resfriamento das meias-carcaças, provavelmente podendo ser atribuído à manipulação das mesmas durante a desossa e embalagem dos cortes

Os resultados parciais obtidos podem ser considerados preocupantes, uma vez que *C. estertheticum* é um agente deteriorante comprovadamente importante na deterioração da carne bovina refrigerada e embalada a vácuo, sendo vários os episódios de grande significado, descritos na literatura mundial. Soma-se a isto, a importância da exportação deste tipo de produto pelo Brasil. Outro aspecto a considerar é que estes resultados integram, juntamente com outros de trabalhos em andamento no laboratório, os dados iniciais referentes ao estudo desta bactéria, até então sem relato de ocorrência no Brasil.

#### 4. CONCLUSÃO

- Os cortes cárneos resfriados embalados a vácuo apresentaram índices de positividade para *C. estertheticum* foram superiores aos verificados em swabs de superfície de meias-carcaças;
- O aumento da contaminação após o resfriamento das meias-carcaças, provavelmente seja devido à manipulação durante a desossa e embalagem dos cortes;
- Os resultados obtidos no presente trabalho indicam a disseminação de *C. estertheticum* nos diferentes Estados brasileiros.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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**, 94, pp.515-522, 1998.

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

HELPS, C. R., HARBOUR, D. A., AND CORRY, J. E. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *C. estertheticum* causing spoilage en vacuum-packed chill-stored beef. **International Journal of Food Microbiology**. 52, pp. 57-65, 1999.

PARDI, M. C; SANTOS, I. F; SOUZA, E. R. **Ciência, Higiene e Tecnologia da carne**. Goiânia: CEGRAF-UFG/ Niterói: EDUFF, v. 1., 586 p., 2001.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; HAAS, P. E. W.; SOLL, E. R. van EMBDEN, J. D. A. Occurrence and stability of insertion sequences in sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiology**, 29, p 2578-86, 1991.

#### FONTE DE FINANCIAMENTO - CNPq

---

1. Mestranda em Ciência Animal -UFG [ursula\\_nunes@terra.com.br](mailto:ursula_nunes@terra.com.br)

2. Bolsistas de Iniciação Científica, PIBIC

3. Professora da Escola de Veterinária – UFG [inag@terra.com.br](mailto:inag@terra.com.br)

4. Orientador, professor da Escola de Veterinária – UFG [mesquita@funape.org.br](mailto:mesquita@funape.org.br)