

**CAIO FIALHO DE FREITAS**

**POPULAÇÕES DE *CLOSTRIDIUM SPP.* EM CARNE BOVINA EMBALADA A VÁCUO ASSOCIADAS A *BLOWN PACK***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Luís Augusto Nero

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus

T	Freitas, Caio Fialho de, 1996-
F866p	Populações de <i>Clostridium spp.</i> em carne bovina embalada a
2022	vácuo associadas a <i>blown pack</i> . / Caio Fialho de Freitas. - Viçosa, MG, 2022.
	1 dissertação eletrônica (75 f.): il. (algumas color.).
	Inclui anexos.
	Orientador: Luis Augusto Nero
	Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, 2022.
	Inclui bibliografia.
	DOI: <a href="https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.702">https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.702</a>
	Modo de acesso: World Wide Web.
	1. Microbiologia veterinária; 2. Carne de boi - Conservação; 3. <i>Clostridium spp</i> ; 4. <i>Clostridium perfringens</i> ; I. Nero, Luis Augusto II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária III. Título
	CDD 22. ed. 636.0896

Bibliotecário(a) responsável: BRUNA SILVA CRB-6/2552

CAIO FIALHO DE FREITAS

POPULAÇÕES DE *CLOSTRIDIUM SPP.* EM CARNE BOVINA EMBALADA A  
VÁCUO ASSOCIADAS A *BLOWN PACK*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

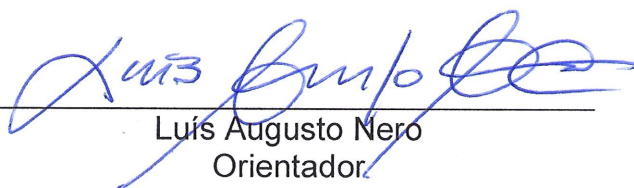
APROVADA: 29 de julho de 2022.

Assentimento:



---

Caio Fialho de Freitas  
Autor



---

Luís Augusto Nero  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre comigo.

Aos meus pais, Paulo e Cici; meus irmãos, Henrique e Guilherme; meus avós maternos, Renato e Ilma; meus avós paternos, Nico e Teresinha, em saudosa lembrança; e a todos meus familiares e amigos pelo apoio, incentivo, paciência e compreensão em toda a execução do trabalho.

Ao meu orientador e professor, Luís Augusto Nero, pela oportunidade, orientação, incentivo, atenção e ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador e professor, Ricardo Seiti Yamatogi, pela orientação, incentivo, atenção e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Veterinária, pela ajuda durante o desenvolvimento do trabalho e por sempre serem prestativos e atenciosos.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pela ajuda e companheirismo durante a execução do experimento, além de tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e estrutura fornecida para o desenvolvimento do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

FREITAS, Caio Fialho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Populações de *Clostridium spp.* em carne bovina embalada a vácuo associadas a *blown pack*.** Orientador: Luís Augusto Nero.

A carne bovina é uma das variedades de carne mais consumidas no mundo e tem relevante importância para a economia. A embalagem a vácuo é comumente utilizada para estender a vida útil deste produto, impedindo a multiplicação de microrganismos aeróbios. No entanto, o ambiente de anaerobiose gerado permite a multiplicação de microrganismos anaeróbios, como *Clostridium spp.*, que podem causar prejuízos consideráveis às indústrias de alimentos, como a deterioração *blown pack*. O objetivo do estudo foi associar a presença e contagens de *Clostridium* sulfito redutor e *Clostridium perfringens* em carne bovina embalada a vácuo com a deterioração *blown pack*, considerando diferentes temperaturas de conservação. Amostras de carne bovina embalada a vácuo (n = 10) foram armazenadas a 4 °C e 15 °C durante o período de 28 dias, com monitoramento semanal das contagens de *Clostridium* sulfito redutor e *C. perfringens* e verificação da presença da deterioração *blown pack*. A presença de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* foi constatada em 70% das amostras. Dos isolados característicos obtidos, 100% foram confirmados como *Clostridium* sulfito redutores e 79,8% foram identificados como *C. perfringens*. A contagem máxima de *Clostridium* sulfito redutor a 4 °C e 15 °C foi de 0,39 log<sub>10</sub> UFC/g e 2,03 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente. A contagem máxima de *C. perfringens* a 4 °C e 15 °C foi de 0,18 log<sub>10</sub> UFC/g e 1,74 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente. Alternativamente, observamos o surgimento da deterioração *blown pack* em 90% das amostras armazenadas a 15 °C. Através dos resultados obtidos, podemos concluir que a temperatura de refrigeração a 4 °C controlou a multiplicação desses microrganismos quando comparado com a temperatura inadequada de armazenamento, a 15 °C, durante o período de 28 dias. Além disso, concluímos que a carne bovina embalada a vácuo, quando armazenada em temperatura inadequada de 15 °C, em um período aproximado de 7 a 21 dias, pode apresentar o surgimento da deterioração *blown pack*.

Palavras-chave: Carne bovina. *Clostridium spp.* *Clostridium perfringens.* *Blown pack.*

## ABSTRACT

FREITAS, Caio Fialho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2022. ***Clostridium spp.* populations in vacuum-packed beef associated with *blown pack***. Adviser: Luís Augusto Nero.

Beef is one of the most consumed varieties of meat in the world and is of great importance for the economy. Vacuum packaging is commonly used to extend the shelf life of this product, preventing the multiplication of aerobic microorganisms. However, the generated anaerobic environment allows the multiplication of anaerobic microorganisms, such as *Clostridium spp.*, which can cause considerable damage to the food industry, such as blown pack spoilage. The objective of the study was to associate the presence and counts of *Clostridium* sulfite reducer and *Clostridium perfringens* in vacuum-packed beef with blown pack spoilage, considering different storage temperatures. Vacuum packed beef samples (n = 10) were stored at 4 °C and 15 °C for a period of 28 days, with weekly monitoring of *Clostridium* sulphite reducing and *C. perfringens* counts and verification of the presence of blown pack spoilage. The presence of sulfite-reducing clostridia and *C. perfringens* was found in 70% of the samples. Of the characteristic isolates obtained, 100% were confirmed as *Clostridium* sulfite reducers and 79.8% were identified as *C. perfringens*. The maximum count of *Clostridium* reducing sulfite at 4 °C and 15 °C was 0.39 log<sub>10</sub> CFU/g and 2.03 log<sub>10</sub> CFU/g, respectively. The maximum count of *C. perfringens* at 4 °C and 15 °C was 0.18 log<sub>10</sub> CFU/g and 1.74 log<sub>10</sub> CFU/g, respectively. Alternatively, we observed the appearance of blown pack spoilage in 90% of samples stored at 15 °C. Through the results obtained, we can conclude that the refrigeration temperature at 4 °C controlled the multiplication of these microorganisms when compared to the inadequate storage temperature, at 15 °C, during the period of 28 days. In addition, we concluded that vacuum-packed beef, when stored at an inappropriate temperature of 15 °C, for an approximate period of 7 to 21 days, may present the appearance of blown pack deterioration.

Keywords: Beef. *Clostridium spp.* *Clostridium perfringens*. *Blown pack*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Amostra armazenada a 4 °C analisada no dia 0, sem distensão da embalagem.....71
- Figura 2:** Amostra armazenada a 4 °C analisada após 28 dias de estocagem, sem distensão da embalagem.....71
- Figura 3:** Amostra armazenada a 15 °C analisada após 14 dias de estocagem, com considerável distensão da embalagem e características repugnantes.....72
- Figura 4:** Amostra armazenada a 15 °C analisada após 21 dias de estocagem, com considerável distensão da embalagem e características repugnantes.....72
- Figura 5:** Amostra armazenada a 15 °C analisada após 28 dias de estocagem, com considerável distensão da embalagem e características repugnantes.....73
- Figura 6:** Reação em cadeia da polimerase.....73
- Figura 7:** Reação em cadeia da polimerase.....74

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Amostras de carne bovina resfriada sem osso embaladas a vácuo analisadas.....31
- Tabela 2:** Influência da temperatura de armazenamento nas médias das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*.....38
- Tabela 3:** Influência da temperatura de armazenamento nas médias das contagens de clostrídios sulfito redutores.....39
- Tabela 4:** Influência da temperatura de armazenamento nas médias das contagens de *C. perfringens*.....39
- Tabela 5:** Influência do tempo de incubação das placas (24 e 72 horas) e da temperatura de armazenamento das amostras (4 °C e 15 °C) nas médias das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores.....47

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Contagens de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* das amostras armazenadas a 4 °C durante 28 dias de estocagem.....37
- Gráfico 2:** Contagens de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* das amostras armazenadas a 15 °C durante 28 dias de estocagem.....38
- Gráfico 3:** Número de isolados em relação ao dia de estocagem das amostras.....44
- Gráfico 4:** Número de isolados em relação à temperatura de armazenamento das amostras.....44
- Gráfico 5:** Contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores realizada com 24 horas de incubação.....46
- Gráfico 6:** Contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores realizada com 72 horas de incubação.....46
- Gráfico 7:** Comparação das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores (24 e 72 horas) das amostras armazenadas a 4 °C.....47
- Gráfico 8:** Comparação das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores (24 e 72 horas) das amostras armazenadas a 15 °C.....48

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APPCC: Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPP: Boas Práticas de Produção

BPF: Boas Práticas de Fabricação

BPW: *Buffered Peptone Water* (Água Peptonada Tamponada)

dATP: desoxiadenosina trifosfatada

dCTP: desoxicitidina trifosfatada

dGTP: desoxiguanosina trifosfatada

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTA: Departamento de Tecnologia de Alimentos

dTTP: desoxitimidina trifosfatada

DVT: Departamento de Veterinária

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças)

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

H<sub>2</sub>S: Sulfeto de hidrogênio

LPSN: *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato-salino)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PPHO: Procedimento Padrão de Higiene Operacional

POP: Procedimento Operacional Padrão

RPM: Rotações por minuto

rRNA: Ácido ribonucleico ribossômico

TGM: *Thioglycollate Medium* (Meio Tioglicolato)

TSC: *Tryptose Sulfite Cycloserine* (Tryptona-Sulfito-Cicloserina)

UFC: Unidade formadora de colônias

USDA: *United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)

## LISTA DE ACRÔNIMOS

ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

APHA: *American Public Health Association* (Associação Americana de Saúde Pública)

Biomol: Laboratório de Biologia Molecular

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUA: Estados Unidos da América

InsPOA: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal

ISO: *International Organization for Standardization* (Organização Internacional de Normalização)

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

RIISPOA: Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SIE: Serviços de Inspeção Estadual

SIF: Serviço de Inspeção Federal

SIM: Serviço de Inspeção Municipal

USA: *United States of America*

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

% : porcentagem

+ : positivo

- : negativo

°C: graus celsius

cm: centímetro

g: grama

kg: quilograma

log<sub>10</sub>: logaritmo decimal de base 10

mM: milimolar

mL: mililitro

nM: nanomolar

pb: par de bases

pH: potencial hidrogeniônico

p/v: peso/volume

μM: micromolar

μl: microlitro

V: volt

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1. Aspectos gerais .....	15
2.2. Deterioração em carne bovina .....	20
2.3. <i>Clostridium spp.</i> .....	23
2.3.1. Clostrídios sulfito redutores e <i>Clostridium perfringens</i> .....	23
2.3.2. Clostrídios psicrotóxicos, psicrotolerantes e psicrófilos.....	27
3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....	29
3.1. Justificativas .....	29
3.2. Objetivo Geral .....	30
3.3. Objetivos Específicos .....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1. Coleta das amostras .....	30
4.2. Local do experimento .....	31
4.3. Processamento das amostras .....	31
4.4. Análise das amostras .....	32
4.4.1. Preparação das amostras .....	32
4.4.2. Inoculação, incubação, contagem e isolamento de clostrídios sulfito redutores e <i>Clostridium perfringens</i> .....	32
4.4.3. Confirmação de clostrídios sulfito redutores .....	33
4.4.4. Confirmação de <i>Clostridium perfringens</i> .....	33
4.4.4.1. Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina .....	34
4.4.4.2. Teste de redução de nitrato a nitrito e teste de motilidade .....	34
4.4.4.3. Cálculo dos resultados .....	35
4.4.5. Análise estatística .....	35
4.4.6. Estocagem dos isolados .....	35
4.4.7. Identificação molecular dos isolados .....	35
4.4.7.1. Extração do DNA .....	35
4.4.7.2. Identificação molecular de <i>Clostridium sp.</i> .....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
5.1. Contagem de clostrídios sulfito redutores e <i>Clostridium perfringens</i> .....	37

5.2. Isolamento e confirmação bioquímica de clostrídios sulfito redutores e <i>Clostridium perfringens</i> .....	42
5.3. Deterioração <i>blown pack</i> .....	44
5.4. Identificação molecular de <i>Clostridium spp.</i> .....	54
6. CONCLUSÕES .....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
ANEXOS .....	71
ANEXOS A – Normas .....	75

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A carne bovina é uma das variedades de carne mais consumidas em todo o mundo, sendo de suma importância para a nutrição de toda a população mundial. O Brasil tem posição de destaque entre os mais importantes produtores e exportadores de carne bovina. Por isso, é essencial garantir a segurança e qualidade do produto, visando o bem-estar e satisfação do consumidor.

Por ser um alimento rico em nutrientes, a carne bovina é muito perecível e fornece condições muito favoráveis para a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes. O sistema de embalagem a vácuo é uma forma de conservação do alimento muito utilizada na distribuição da carne bovina. Esse sistema reduz a concentração de oxigênio no produto, impedindo o desenvolvimento de microrganismos aeróbios. No entanto, o ambiente de anaerobiose gerado por si só não garante a interrupção da multiplicação de microrganismos anaeróbios e conseqüentemente a garantia de segurança e qualidade do alimento.

*Clostridium perfringens* é um dos microrganismos de maior preocupação mundial, considerado um importante agente de doenças de origem alimentar e envolvido em diversos surtos por toxinfecção alimentar nas últimas décadas. Além disso, a presença de espécies de *Clostridium* psicrotóxicos na carne bovina embalada a vácuo pode permitir o surgimento da deterioração *blown pack*, trazendo prejuízos consideráveis às indústrias do setor.

A detecção de *Clostridium spp.* em carne bovina embalada a vácuo tem relevante importância, tanto do ponto de vista econômico quanto do epidemiológico, visto que a deterioração pode trazer consideráveis perdas econômicas às indústrias e as espécies patogênicas desse gênero podem trazer problemas à saúde pública.

Considerando isso, o objetivo do estudo foi associar a presença e contagens de *Clostridium* sulfito redutor e *Clostridium perfringens* em carne bovina embalada a vácuo com a deterioração *blown pack*, considerando diferentes temperaturas de conservação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aspectos gerais

O consumo de carne bovina no mundo atingiu mais de 59 milhões de toneladas em 2020 (USDA, 2020). Esse produto é um alimento que traz vários benefícios à saúde humana, rico em proteínas e outros nutrientes, como as vitaminas do complexo B e alguns sais minerais (fonte de ferro, potássio, zinco, fósforo, magnésio e selênio).

O Brasil é um dos mais importantes produtores e exportadores de carne bovina do mundo, utilizando de tecnologia avançada e alto investimento em todos os setores da produção, resultando em elevada produtividade e excelência na qualidade do produto acabado, seguindo os mais rigorosos padrões de qualidade. Dados de 2019 mostram o Brasil com o maior rebanho de bovinos do mundo, com cerca de 213,68 milhões de cabeças. Neste mesmo ano a pecuária brasileira registrou o abate de 43,3 milhões de cabeças, onde 10,4 milhões (24%) destes abates não foram fiscalizados e 32,9 milhões (76%) receberam fiscalização de algum órgão, sendo 24,2 milhões (55,90%) pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), 6,5 milhões (14,96%) pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e 2,2 milhões (5,19%) pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM) (ABIEC, 2019). Além disso, a produção de carne bovina (incluindo a produção de carne bubalina) foi de 10,5 milhões de toneladas no ano de 2019, representando 14,8% da produção de carne bovina do mundo, sendo que aproximadamente 8 milhões (76,2%) de toneladas são destinadas ao consumo no próprio Brasil (terceiro maior consumidor de carne bovina do mundo), gerando um consumo “per capita” de 38,38 kg/hab/ano (segundo maior consumo “per capita” de carne bovina do mundo); e cerca 2,5 milhões (23,8%) de toneladas são destinadas à exportação, tornando o Brasil o maior exportador de carne bovina do mundo, exportando para mais de 150 países. Neste ano, a exportação de carne bovina já apresentava uma representatividade de 3,9% das exportações brasileiras, com expressiva importância na economia do país (ABIEC, 2019).

Um ponto muito importante na cadeia produtiva da carne bovina é a qualidade final do produto, com ênfase para as características sensoriais (frescor, textura e palatabilidade), características físicas (cor, maciez e capacidade de retenção de água) e garantia de segurança do alimento. Há diversos fatores intrínsecos e

extrínsecos que podem influenciar na qualidade da carne, como a idade, a raça e o sexo do animal, os fatores nutricionais, o estresse, o transporte dos animais, a insensibilização e a sangria, dentre outros diversos fatores (Felício, 1999; Melo et al., 2016).

A segurança alimentar e a qualidade do alimento tem ligações contundentes. A qualidade do alimento abrange todos os atributos sensoriais necessários para satisfazer as expectativas do consumidor e por isso pode ser considerada principalmente uma questão econômica decidida por esses consumidores. A segurança alimentar pode ser considerada como os procedimentos e ações tomadas pelas indústrias de alimentos a fim de reduzir o risco de contaminação e garantir a segurança final do produto para o consumo (Akkerman et al., 2010; Aung e Chang, 2014; Chen et al., 2014; Blagojevic et al., 2014; Rodrigues et al., 2019).

Os aspectos relativos à segurança da carne passam por todo o sistema de produção, desde o alimento fornecido para os animais até a carne embalada presente no comércio varejista. Por isso, é essencial o desenvolvimento de tecnologias associadas à segurança do alimento em toda a cadeia produtiva, visando a prevenção, detecção e adoção de medidas de controle, além da erradicação de doenças nos rebanhos produtores relacionados a carne bovina (EMPRAPA, 2017).

Os programas de sanidade animal, a inspeção industrial e os programas de autocontrole das indústrias de alimentos foram desenvolvidos para garantir a qualidade e inocuidade dos produtos e estão sendo constantemente aprimorados.

Um dos pontos mais importantes relacionados à segurança alimentar da cadeia produtiva da carne bovina é a fiscalização e a inspeção oficial de todo o sistema de produção, além dos programas responsáveis para o controle de perigos e riscos à saúde humana e a higiene dos processos em todo o setor produtivo (Blagojevic et al., 2014). Há diversos programas utilizados para o controle de perigos visando garantir a segurança e a qualidade do alimento, como Boas Práticas de Produção (BPP), Boas Práticas de Fabricação (BPF), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Procedimento Operacional Padrão (POP).

A atuação das agências reguladoras governamentais de inspeção de produtos de origem animal é de extrema importância no controle da qualidade e da segurança alimentar, reduzindo potenciais riscos com a aplicação de normas e

detecção de problemas na produção que ajudam a prevenir e identificar casos de contaminação dos alimentos (Rodrigues et al., 2019). No Brasil, essa fiscalização e inspeção de produtos de origem animal é realizada por médicos veterinários que atuam como fiscais agropecuários em instituições públicas de âmbito nacional, estadual ou municipal. A legislação brasileira relativa à inspeção de produtos de origem animal está descrita no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Mesmo com a atuação dos serviços de fiscalização e inspeção de produtos de origem animal sendo intensificadas e ficando mais rigorosas nos últimos anos, o Brasil ainda enfrenta diversos problemas em todo o setor da cadeia produtiva da carne bovina. A segurança e qualidade do alimento pode ser prejudicada por perigos biológicos, químicos e físicos. Entre esses perigos, os biológicos estão envolvidos em problemas representativos à saúde pública e perdas econômicas. Em economias em desenvolvimento, como no Brasil, ainda existem fraquezas no monitoramento adequado de todos os estabelecimentos e esse déficit acaba interferindo na detecção de possíveis contaminações por microrganismos deteriorantes e patogênicos, afetando a qualidade e inocuidade dos alimentos (Blagojevic et al., 2014; Rodrigues et al., 2019).

A contaminação da carne bovina por microrganismos pode ocorrer durante a cadeia produtiva de diversas maneiras e em distintas etapas, incluindo o abate, corte, processamento, armazenamento e distribuição das carnes. As fontes de contaminação podem incluir água, instalações, equipamentos e os manipuladores. A etapa de esfola é particularmente importante, devido à alta carga microbiana que existe na superfície do couro do animal (Hedrick et al., 1993; Caranova, 2008; Hernández-Macedo et al., 2011; Obara et al., 2011).

As principais fontes de contaminação da carne bovina dentro do abatedouro são as fezes e o couro dos próprios animais. A entrada dos microrganismos nas plantas de processamento de carne bovina ocorre provavelmente através das partículas do solo ou material fecal ligados à pele dos animais (Broda et al., 2002; Boerema et al., 2003; Broda, 2007). O solo, em particular, é um reservatório de esporos de *Clostridium spp.* Esses esporos conseguem sobreviver nesse ambiente em condições adversas incluindo exposição ao oxigênio, produtos químicos e altas temperaturas por um longo período e são transferidos para a carne bovina através

do contato entre o couro e a carcaça durante a esfolagem ou das fezes dos animais (Boerema et al., 2003; Brightwell et al., 2009; Moschonas et al., 2009; Moschonas et al., 2011). Acredita-se que a frequência e a gravidade dos incidentes comerciais em carne bovina embalada a vácuo poderia ser minimizada pela remoção ou limitação da transferência dos clostrídios das principais fontes de contaminação (partículas de solo e material fecal) para as carcaças dos animais durante o abate (Boerema et al., 2003; Moschonas et al., 2009).

Como a carne bovina é um alimento suscetível à contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes, algumas técnicas de conservação são aplicadas aos produtos cárneos. Temperaturas de armazenamento, embalagem a vácuo, embalagem com atmosfera modificada, embalagem com atmosfera controlada, entre outras estratégias foram encontradas para controlar a associação microbiana no produto cárneo (Nychas et al., 2008; Ercolini et al., 2011; Pennacchia et al., 2011; Doulgeraki et al., 2012; Duran e Kahve, 2020).

A manutenção da carne em temperaturas de refrigeração é particularmente importante a fim de controlar os microrganismos (psicrotróficos, psicrotolerantes e psicrófilos). Bell et al. (2001) relatou que um aumento na temperatura de 1,5 °C para 4 °C encurtou significativamente o tempo para a produção inicial de gás em carnes embaladas a vácuo produzidos por espécies de *Clostridium spp.* A temperatura de refrigeração deve ser aplicada na cadeia produtiva da carne bovina para garantir que o produto mantenha uma temperatura uniforme. A carne é considerada resfriada quando é mantida entre -1,5 °C e 7 °C durante todo o tempo após o processo de post mortem. A temperatura ideal de armazenamento e transporte para a carne refrigerada é a menor temperatura possível na qual não ocorra o congelamento da carne. A carne geralmente começa a congelar a -1,5 °C e a carne embalada a vácuo a -2 °C, dependendo do tipo de carne e o pH (Luchiari, 2006; Hernández-Macedo et al., 2011).

A embalagem a vácuo é um método de conservação comumente utilizado na indústria de carne, especialmente para preservar a qualidade e estender o prazo de validade do produto. Essa técnica visa proteger o produto cárneo do contato com o oxigênio do ar. O oxigênio promove condições para a multiplicação de microrganismos aeróbicos, que podem mudar o odor, cor e a aparência dos produtos. Essa estratégia tem se mostrado eficiente para garantir a extensão da vida útil do produto, preservando as suas características sensoriais. Dentre os sistemas

de embalagem de carne estabelecidos, a embalagem a vácuo é o mais utilizado no mercado para a distribuição de peças inteiras (Jeremiah, 2001; Sarantópoulos, 2001; Hernández-Macedo et al., 2011).

Geralmente, dois indicadores microbianos são utilizados para avaliar a qualidade do produto cárneo em relação as bactérias formadoras de esporos: clostrídios sulfito-redutores e *Clostridium perfringens*. Ambos são amplamente utilizados como indicadores de contaminação clostridial em alimentos (Prevost et al., 2013).

Os clostrídios sulfito redutores são bactérias do gênero *Clostridium* que reduzem o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e sua aplicação na análise de alimentos consiste em oferecer uma indicação simples e rápida da potencial presença de *C. perfringens* (sulfito redutor) (Silva et al., 2017). Dentre as espécies patogênicas, podemos destacar *C. perfringens* como um importante agente de doenças de origem alimentar envolvido em diversos surtos por toxinfecção alimentar. Essas toxinfecções resultam da ingestão de alimentos contaminados com a enterotoxina produzida por este agente (Rood and Cole, 1991; Rood et al., 2018).

Dentre os cortes cárneos, o acém bovino (também conhecido como agulha) é um corte derivado da parte dianteira do animal (região do pescoço). Esse corte bovino é uma peça relativamente magra e considerada a mais macia do dianteiro. No Brasil, o acém bovino é um corte cárneo muito comercializado e que gera boas margens de lucro para as indústrias de alimentos. Por ficar localizado na região do pescoço, o acém é um corte bem propício de sofrer contaminações no processo de abate do animal no frigorífico, principalmente nas etapas de sangria e esfolagem do animal. Portanto, devido a esse conjunto de características, pode ser considerado um bom corte cárneo para a detecção de microrganismos deteriorantes e patogênicos.

A deterioração da carne é caracterizada pela interação das modificações físico-químicas e biológicas causadas por bactérias deteriorantes. A carne bovina, quando fora do prazo de validade, contaminada ou armazenada, transportada e comercializada fora dos padrões exigidos pela legislação vão apresentar características indesejáveis ao consumidor, como alteração de cor, produção de um forte odor, produção de limosidade, entre outras (Doulgeraki et al., 2013; Neoprospecta, 2019; Duran e Kahve, 2020; Silva et al., 2020).

Um dos principais problemas relatados em diversos lugares do mundo em carne bovina embalada a vácuo é a deterioração *blown pack*. Esse tipo de deterioração é causado por microrganismos anaeróbicos e caracterizado principalmente pela distensão da embalagem a vácuo. Essa distensão ocorre pela abundante produção de gases (principalmente dióxido de carbono) durante o processo de estocagem do produto, ocasionada principalmente por microrganismos do gênero *Clostridium*, além das enterobactérias e bactérias lácticas. Ainda, o odor desagradável, a alteração da cor da carne e outras características indesejáveis tornam o produto inapropriado ao consumo humano, trazendo consideráveis perdas econômicas às indústrias de alimentos (Broda et al., 1996; Broda et al., 2000).

As espécies psicotróficas de *Clostridium spp.* são usualmente consideradas os principais agentes responsáveis pela deterioração *blown pack*. Essas espécies psicotróficas são caracterizadas por se desenvolverem em baixas temperaturas. Há relatos desses microrganismos se desenvolvendo e causando deterioração em produtos cárneos em temperaturas de refrigeração. *Clostridium estertheticum* e *Clostridium gasigenes* são as espécies mais frequentemente identificados como os agentes causadores deste tipo de deterioração; outras espécies, como *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium frigoris*, *Clostridium bowmanii* e *Clostridium frigidicarnis*, também já foram associadas com a produção de gás e consequente deterioração *blown pack* (Collins et al. 1992; Kalchayanand et al. 1993; Broda et al., 1998; Clemens et al., 2010). Apesar da importância desses microrganismos deteriorantes para as indústrias, os estudos são desafiadores pela falta de meios diferenciais ou métodos discriminatórios diretos para a identificação específica dessas espécies psicotróficas. As ferramentas moleculares atualmente disponíveis, como o *16S rRNA Sequencing*, tem auxiliado nessa identificação.

As preocupações com os aspectos microbiológicos da carne bovina tem aumentado ao longo dos últimos anos devido ao aumento da produção, comercialização e exportação dos produtos cárneos em todo o mundo (Hernández-Macedo et al., 2011).

## **2.2. Deterioração em carne bovina**

A carne bovina é reconhecida como um dos alimentos mais perecíveis devido a sua composição, que é rica em nutrientes, tem pH entre 5,5 e 6,5 e possui uma

alta atividade de água. A multiplicação de microrganismos indesejáveis que contaminam a superfície da carne a níveis inaceitáveis causando a degradação dos nutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) e contribuem significativamente para a deterioração da carne, tornando o produto inadequado para o consumo humano. Essa atividade microbiana é de extrema preocupação para as indústrias de alimentos e é o fator que mais interfere na deterioração. Os principais grupos de microrganismos responsáveis pela deterioração da carne em diferentes condições de armazenamento incluem espécies da Família Enterobacteriaceae, bactérias lácticas (BAL), *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.* e *Brochothrix thermosphacta* (Collins et al., 1992; Nychas et al., 2008; Adam et al., 2010; Hernández-Macedo et al., 2011; Doulgeraki et al., 2012).

O processo de deterioração da carne depende do tipo de microrganismo e do inóculo inicial, além das condições específicas de armazenamento. A carga microbiana inicial depende do estado fisiológico do animal no abate e da propagação da contaminação dentro do abatedouro e durante o processamento da carne. A temperatura e outras condições de armazenamento durante a distribuição também podem influenciar no processo da deterioração (Nychas et al., 2008; Doulgeraki et al., 2012). A maioria dos estudos sobre a deterioração de cortes de carne bovina embalados a vácuo e resfriados são dedicados ao isolamento ou identificação de espécies psicotróficas de *Clostridium spp.* (Adam et al., 2010).

O primeiro relato científico relacionado a deterioração *blown pack* em carne refrigerada embalada a vácuo ocorreu em 1989 (Dainty et al., 1989). A deterioração *blown pack* é caracterizada pela distensão da embalagem a vácuo do produto cárneo. Essa distensão ocorre pelo acúmulo exacerbado de alguns gases, como dióxido de carbono, hidrogênio, nitrogênio e gás sulfídrico. A deterioração *blown pack* geralmente inclui a produção de voláteis indesejáveis como butanol, ácido butanoico, etanol, ácido acético e ésteres derivados desses compostos; além de uma série de compostos sulfurados (possuem um ou mais átomos de enxofre ligados à cadeia carbônica) associados a um cheiro pútrido e um brilho metálico na carne deteriorada. Pode ocorrer durante o armazenamento prolongado do produto apresentando apenas uma distensão modesta da embalagem a vácuo; ou também pode ocorrer bem antes do final da vida útil esperada, com considerável distensão da embalagem. Dentre os microrganismos causadores da deterioração *blown pack*, é geralmente relatado que as espécies psicotróficas, psicrotolerantes e psicofílicas

de *Clostridium spp.* são os principais agentes deteriorantes (Dainty e Mackey, 1992; Broda et al., 1998; Brightwell et al., 2007; Byrne et al., 2009; Hernández-Macedo et al., 2011).

A deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo causada pelas espécies psicrotróficas, psicrotolerantes ou psicrófilas de *Clostridium spp.* geralmente ocorre dentro de 4 a 6 semanas e torna o produto inaceitável, com características sensoriais repugnantes, resultando em expressivas perdas financeiras às indústrias de alimentos e na redução da confiança por parte do consumidor (Broda et al., 1996; Adam et al., 2010; Brightwell et al., 2018).

Esses episódios de deterioração *blown pack* geralmente ocorrem devido ao armazenamento dos produtos cárneos em temperaturas inadequadas, que permitem a multiplicação desses microrganismos deteriorantes e podem ocorrer por uma série de fatores, incluindo o nível inicial de inóculo, pH da carne, nível de vácuo dentro das embalagens e a disponibilidade de substrato adequada para o crescimento da bactéria (Broda et al., 1996; Adam et al., 2010; Clemens et al., 2010; Silva et al., 2012).

A deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo causada por *Clostridium spp.* é de ocorrência mundial e há décadas tem sido relatada em diversos países, como nos EUA (Kalchayanand et al., 1989), Reino Unido (Dainty et al., 1989; Lawson et al., 1994), Nova Zelândia (Broda et al., 1996), África do Sul (Helps et al., 1999), Alemanha (Pichner et al., 2012), Irlanda (Bolton et al., 2015) e Europa (Helps et al., 1999; Byrne et al., 2009). No Brasil, a ocorrência da deterioração *blown pack* causada por clostrídios em carne bovina embalada a vácuo foi comprovada em alguns estudos (Rauecker et al., 2006; Felipe, 2008; Rosa, 2009; Hernández-Macedo et al., 2009; Silva et al., 2011).

A deterioração *blown pack* pode ocorrer mesmo na ausência do abuso de temperatura, durante o armazenamento refrigerado da carne bovina embalada a vácuo. Por isso, as indústrias de carne precisam ser mais cautelosas e preocupadas em relação a contaminação do ambiente e da carne, principalmente por espécies de *Clostridium spp.* psicrotróficas (Brightwell et al., 2009; Jones et al., 2009; Silva et al., 2011). Diversas espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Clostridium* foram associadas como agentes causadores da deterioração *blown pack* em produtos cárneos embalados a vácuo, incluindo: *Clostridium estertheticum* (Collins et al., 1992); *Clostridium estertheticum subsp. laramiense* (Kalchayanand et al., 1993);

*Clostridium algidicarnis* (Lawson et al., 1994); *Clostridium frigidicarnis* (Broda et al., 1999); *Clostridium gasigenes* (Broda et al., 2000); *Clostridium bowmanii* (Spring et al., 2003); *Clostridium frigoris* (Spring et al., 2003) e *Clostridium tagluense* (Suetin et al., 2009).

### **2.3. *Clostridium* spp.**

#### **2.3.1. *Clostridium* sulfito redutores e *Clostridium perfringens***

*Clostridium* spp. é um gênero bacteriano amplamente distribuído na natureza, pertencente ao Reino Monera, Classe Clostridia, Ordem Clostridiales, Família Clostridiaceae e Filo Firmicutes. São bacilos Gram-positivos, formadores de esporos, anaeróbios estritos e aerotolerantes. Segundo a *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN), criada pelo pesquisador Jean P. Euséby, atualmente (2022) há citações de 357 espécies e 12 subespécies de *Clostridium*, apresentando diversas características distintas (Silva et al., 2017; LPSN, 2022).

*Clostridium* sulfito redutores são considerados indicadores de contaminação em produtos cárneos. As análises relacionadas a esses microrganismos devem ocorrer de forma periódica e são definidas a fim de monitorar os níveis de contaminação nos alimentos. *Clostridium* sulfito redutores não possuem uma classificação taxonômica, sendo classificados apenas por características fenotípicas em comum (Prevost et al., 2013).

*Clostridium perfringens* é uma das bactérias patogênicas mais prevalentes de rápido crescimento no mundo; é uma bactéria anaeróbica, Gram-positiva, em formato de bastonetes, imóvel, sulfito-redutora e formadora de esporos. Essa capacidade de formar esporos protege a célula bacteriana contra condições de estresse, como exposição ao calor e oxigênio, permitindo que sobrevivam em ambientes variados e através de processos térmicos. *C. perfringens* é amplamente encontrado na natureza, podendo ser isolado do solo, superfícies de vegetais, poeira, sistema gastrointestinal de humanos e animais, além de alimentos crus e processados. Embora possam ser isolados de diferentes tipos de alimentos, é frequentemente encontrado em carnes e produtos cárneos, sendo que estes produtos são fonte de aminoácidos que não podem ser produzidos por *C. perfringens* e que são necessários para a multiplicação deste patógeno. *C.*

*perfringens* é um microrganismo que pode se multiplicar em temperaturas de 15 °C a 50 °C, com temperatura ótima de multiplicação em torno de 45 °C. Além disso, este patógeno é capaz de multiplicar em temperaturas de refrigeração. Devido a todas essas características, *C. perfringens* tem sido considerado um importante patógeno que pode ser veiculado por alimentos contaminados (Juneja et al., 1994; Andersson et al., 1995; Brynestad e Granum, 2002; Juneja et al., 2010; Aras e Hadimli, 2015; Garcia et al., 2019; Khan et al., 2019; Coşansu e Ersöz 2021; Hassani et al., 2022).

*Clostridium perfringens* é responsável por causar doenças toxinfeciosas. Algumas dessas doenças são associadas aos seres humanos, como gastroenterite e diarreia aguda, em que as toxinas produzidas por este patógeno desempenham um papel importante. A toxinfecção alimentar associada a *C. perfringens* ocorre devido ao manuseio e preparo inadequado dos alimentos. Este microrganismo também está associado a infecções entéricas causadas em várias espécies animais (Aras e Hadimli, 2015; Navarro et al., 2018; Coşansu e Ersöz 2021).

A presença dos esporos de *C. perfringens* em alimentos é um potencial risco para a saúde pública, visto que são altamente resistentes a muitos procedimentos de preservação dos alimentos, como o aquecimento e a refrigeração. A infecção alimentar ocorre devido à ingestão de níveis potencialmente perigosos (cerca de 10<sup>6</sup> UFC/g) de células viáveis do patógeno em alimentos contaminados que foram inadequadamente resfriados ou mantidos em temperatura ambiente por um tempo considerável depois do cozimento. Logo, os esporos ativados pelo calor podem germinar e multiplicar se os produtos forem posteriormente resfriados incorretamente ou sofrerem um abuso de temperatura (Juneja et al., 1996; Novak e Yuan, 2003; Juneja et al., 2006; Juneja et al.; 2013).

Este patógeno pode produzir e secretar até 16 toxinas em diferentes combinações. Entretanto, alfa, beta, épsilon, iota, enterotoxina e NetB são as seis principais toxinas extracelulares produzidas e secretadas. De acordo com as toxinas produzidas, *C. perfringens* pode ser subdividido em sete sorotipos: A, B, C, D, E, F e G. As toxinas alfa, beta, épsilon, iota, enterotoxina e NetB são codificadas pelos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iot*, *cpe* e *netB*, respectivamente. A maioria das doenças causadas por cepas deste patógeno são mediadas pela combinação de uma ou mais dessas toxinas (Hunter et al., 1993; Petit et al., 1999; Gkiourtzidis et al., 2001; Uzal e Songer, 2008; Rood et al., 2018; Duracova et al., 2019).

Todos os sorotipos de *C. perfringens* produzem a toxina alfa, codificada pelo gene *cpa*. Geralmente, as cepas deste patógeno tem uma cópia do gene *cpa* presente no cromossomo; enquanto os genes das outras toxinas (*cpb*, *etx*, *iot* e *netB*) estão sempre localizadas nos plasmídeos, com exceção do gene *cpe*, que pode estar localizado tanto no cromossomo quanto nos plasmídeos (Brynstad e Granum, 2002; Rood et al., 2018; Jang et al., 2020).

As estirpes do tipo A são comumente encontradas como parte da microbiota intestinal normal dos animais e tem sido associadas com a gangrena gasosa, septicemia e a intoxicação alimentar em humanos. As estirpes do tipo C podem causar a enterite necrótica e as estirpes do tipo D causam disenteria e doenças renais em animais (Petit et al., 1999; Brown, 2000; McClane et al., 2012; Aras e Hadimli, 2015).

Alguns dos sintomas provocados pelas toxinfecções alimentares causadas por *C. perfringens* são dor abdominal, dor de cabeça, febre e diarreia cerca de 6 a 24 horas após a ingestão dos alimentos contaminados. Os sintomas geralmente persistem por um dia ou menos e são na maioria das vezes considerados leves; entretanto, a doença pode ser responsável pela morte de pessoas vulneráveis (Mead et al., 1999).

Surtos associados à contaminação de alimentos por *C. perfringens* ocorrem regularmente e muitas vezes podem causar uma morbidade substancial. Entretanto, são evitáveis se a contaminação do alimento for prevenida. De qualquer forma, esses produtos também devem ser manuseados e preparados adequadamente (Bennett et al., 2013; Grass et al., 2013).

Em 2006, na Inglaterra, um estudo estimou que a contaminação por *C. perfringens* foi a segunda causa mais comum de doenças de origem alimentar (atrás apenas de *Campylobacter spp.*) e a segunda causa de morte mais frequente associada às essas doenças (atrás apenas de *Salmonella spp.*) (Lindström et al., 2006). Na União Europeia, *C. perfringens* causou 124 dos 160 surtos alimentares totais ocorridos em 2014 (EFSA-ECDC, 2015). Este patógeno também está relacionado as principais causas de surtos associados à contaminação de alimentos ocorridos em outros países, incluindo Austrália, Japão, Inglaterra e País de Gales (Dalton et al., 2004; Gormley et al., 2011; Komatsu et al., 2012). Nos Estados Unidos, as doenças de origem alimentar causadas por *C. perfringens* causam cerca de um milhão de casos a cada ano, tornando-se a segunda causa mais comum. De

1998 a 2010, foram confirmados 289 surtos causados por *C. perfringens* envolvendo o consumo de alimentos contaminados, sendo relatados 15.208 casos da doença, com 83 internações e 8 óbitos. A carne bovina foi o alimento mais comum relacionada aos surtos (Scallan et al., 2011; Grass et al., 2013).

Estima-se que a toxinfecção alimentar causada por *C. perfringens* do tipo A é mais comum, uma vez que os casos leves não são notificados. Os sintomas causados por essa afecção são geralmente indistinguíveis de outras formas de enterites. Por isso, acredita-se que os surtos alimentares causados por este patógeno são subestimados e o número real seja expressivamente maior. Poucos laboratórios de saúde pública tem recursos suficientes para caracterizar cepas de *C. perfringens* isoladas em surtos de doenças de origem alimentar; além disso, nem todos os focos são detectados e mesmo entre os detectados, nem todos são investigados ou notificados. Esta dinâmica de detecção dos surtos combinada com o fato de que a busca por cuidados médicos é muito baixa confirmam a hipótese de que os pequenos surtos são menos propensos a serem detectados. Desta forma, tanto do ponto de vista epidemiológico quanto do econômico, este microrganismo é considerado um dos patógenos de maior preocupação mundial (Sabah et al., 2003; Juneja et al., 2010; Grass, et al., 2013).

Atualmente, existem poucos estudos sobre a contagem e a prevalência de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* em alimentos, mais especificamente em carne bovina. O método de cultura é considerado como o método padrão para a detecção de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* em amostras de alimentos. No entanto, o desempenho de detecção desse método pode ser bem afetado pela presença de outros microrganismos concorrentes nos alimentos (Chon et al., 2012; Jeong et al., 2017).

A prevalência de *C. perfringens* em amostras de alimentos foi relatada na Argentina em 24,46% (126 das 515 amostras de carne testadas foram positivas) (Stagnitta et al., 2002); Coreia em 3,3% (30 de 925 amostras de carcaças bovinas) (Chae et al., 2006); Japão em 71,0% (143 das 200 amostras de produtos cárneos) (Miki et al., 2008); Costa do Marfim em 12,4% (49 das 395 amostras de alimentos) (Kouassi et al., 2014); Nigéria em 3,5% (14 de 400 amostras de carne bovina) (Tizhe et al., 2015); Nigéria em 13,18% (126 das 515 amostras de alimentos) (Chukwu et al., 2016); Cazaquistão em 9% (18 das 197 amostras de alimentos) (Maikanov et al.,

2019); Coreia em 19% (38 de 200 amostras de frango, carne bovina e carne suína) (Jang et al., 2020).

### 2.3.2. Clostrídios psicotróficos, psicrotolerantes e psicrófilos

Os clostrídios psicotróficos, psicrotolerantes e psicrófilos são microrganismos estritamente anaeróbicos e constituem um grupo microbiano bastante heterogêneo, com muitas cepas intimamente relacionadas. Ainda se sabe pouco sobre eles, mas é conhecido que pertencem a um grupo de clostrídios associados à carne, não produtores de toxinas que deterioram a carne refrigerada embalada a vácuo em aproximadamente quatro semanas (Broda et al., 1998; Stackebrandt et al., 1999; Stackebrandt e Hipe, 2005; Moschonas e Bolton, 2013).

A presença de qualquer *Clostridium* psicotrófico em carne bovina embalada a vácuo deve ser considerada um risco para a estabilidade microbiana do produto durante a sua vida útil. A capacidade dessas espécies em causar a deterioração *blown pack* é uma questão importante para reconhecer seu papel neste tipo de deterioração, devido à diversificada população microbiana encontrada neste produto (Brightwell et al., 2007; Pennacchia, et al., 2011; Silva et al., 2011).

Essas espécies de *Clostridium spp.* contaminam os frigoríficos principalmente por meio de partículas do solo ligadas a pele e as fezes dos animais, contaminando a carne por meio do contato direto ou indireto com as carcaças durante o abate e processamento. Além disso, são mais prováveis de serem encontradas em superfícies da carne, equipamentos e utensílios usados no processo de abate dos animais como células vegetativas (Broda et al., 2002; Boerema et al., 2003. Brightwell et al., 2009; Moschonas et al., 2009; Moschonas et al., 2011).

As espécies psicotróficas de *Clostridium* podem se multiplicar e produzir gás antes e depois da estocagem em temperaturas inadequadas de armazenamento (15°C) e de refrigeração (1,5°C a 2°C). Essas espécies podem causar distensão das embalagens a vácuo em 14 dias em temperaturas de até 2°C (Broda et al., 1997; Broda et al., 2000). De acordo com Adam et al. (2010) essas espécies podem deteriorar a carne bovina embalada a vácuo em até -1,5 °C.

Esses clostrídios associados ao *blown pack* codificam um grande e diversificado espectro de enzimas degradativas resistentes aos carboidratos (*CAZymes*) que lhes permitem utilizar os estoques de carboidratos intramusculares e

facilitar a esporulação. Essas informações sugerem que esses microrganismos ocupam nichos ambientais semelhantes, mas utilizam de diferentes estratégias de metabolismo para serem capazes de coexistir e causar a deterioração na carne (Palevich et al., 2021).

A produção de odores desagradáveis e alterações na cor da carne tem sido descritas como as principais características vistas na deterioração *blown pack* em carne embalada a vácuo causada por *Clostridium algidicarnis* (Boerema et al., 2002; Lawson et al., 1994; Silva et al., 2011). Enquanto a produção de gás responsável pela distensão das embalagens a vácuo e a produção de odores desagradáveis causados pela liberação dos ácidos butanol, butírico e acético são vistos na deterioração *blown pack* em carne embalada a vácuo causada por *Clostridium gasigenes*, que possui temperatura de crescimento na faixa de - 1,5 °C a 22 °C (Broda et al., 2000).

*Clostridium estertheticum* é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos e psicrotrófica, que foi inicialmente isolada de carne bovina embalada a vácuo com deterioração *blown pack* e foi considerada como o principal agente causador dessa deterioração. Além disso, *blown pack* de início mais precoce em carne bovina embalada a vácuo pode ser causada por *C. estertheticum*. Esse microrganismo está presente na pele e nas fezes dos animais e pode ser encontrado no solo. *C. estertheticum* se multiplica a temperatura mínima de 1 °C e máxima de 18 °C (Dainty et al., 1989; Helps et al., 1999; Bolton et al., 2015).

*C. estertheticum* utiliza a glicose durante sua multiplicação no produto cárneo e quando a glicose é esgotada, a sua multiplicação cessa. Então, como alternativa, o microrganismo fermenta o ácido láctico, produzindo uma alta quantidade de gases, principalmente dióxido de carbono e hidrogênio. Essa fermentação exacerbada de ácido láctico em carnes embaladas a vácuo exemplifica a distensão das embalagens (Dainty et al., 1989; Spring et al., 2003; Yang et al., 2009).

Moschonas et al. (2011) demonstrou que *C. estertheticum* foi capaz de causar a deterioração *blown pack* em menor tempo de armazenamento quando comparado com outros microrganismos. O fato desta cepa ser uma verdadeira bactéria psicrófila pode explicar sua capacidade de deteriorar a carne embalada a vácuo armazenada em baixas temperaturas em tempo mais ágil do que outras bactérias.

O isolamento e a detecção das espécies psicrotróficas, psicrotolerantes e psicrófilas de *Clostridium spp.* são desafiadores, visto que essas espécies não

apresentam multiplicação uniforme nos meios de cultura disponíveis. Em alguns casos, para se obter uma cultura viável são necessárias várias semanas ou, em alguns casos, até meses. Conseqüentemente, as informações sobre estes microrganismos deteriorantes são limitadas e ainda não há disponível nenhum controle efetivo para detectar e controlar esse potencial risco para as indústrias de alimentos (Yu et al., 2016; Wambui et al., 2019).

Desta forma, mesmo os protocolos laboratoriais mais rotineiros podem ser frustrantes para serem implementados e solucionar possíveis problemas. Devido às dificuldades encontradas na recuperação desses microrganismos, muitos estudos tem usados métodos moleculares para detectar os clostrídios psicotróficos, seja no ambiente do matadouro ou em carnes embalada a vácuo. Embora essa abordagem leve a altas taxas de ocorrência de *Clostridium* psicotrófico em comparação com as taxas de recuperação das análises microbiológicas tradicionais, a maior limitação dos métodos moleculares é que a capacidade de isolar os agentes da deterioração *blown pack* não podem ser avaliados, uma vez que as células viáveis não são recuperadas (Broda et al., 2000; Broda et al., 2002; Broda et al., 2003; Cavill et al., 2011; Silva et al., 2012; Yu et al., 2016).

### **3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

#### **3.1. Justificativas**

O Brasil é um dos maiores produtores e o maior exportador de carne bovina do mundo, e a manutenção dessa posição demanda um monitoramento contínuo para garantir a qualidade dos produtos comercializados, a segurança do alimento e a manutenção dos acordos comerciais envolvendo os produtos cárneos. *C. perfringens* está associado a diversos casos e surtos de doenças de origem alimentar em todo o mundo e por isso é considerado um patógeno relevante no contexto mundial. Sua incidência em produtos de origem animal é notável e a carne bovina é um dos alimentos com a maior ocorrência. Por isso, a pesquisa e o rastreamento deste patógeno em produtos cárneos é de grande importância para a saúde pública e para a economia. A deterioração *blown pack* da carne bovina embalada a vácuo é um outro problema para as indústrias de alimentos e é responsável por grandes prejuízos financeiros. Espécies psicotróficas de

*Clostridium spp.* estão relacionadas a este tipo de deterioração. Logo, a pesquisa e detecção desses possíveis microrganismos na carne bovina embalada a vácuo é de suma importância. Além disso, há pouco conhecimento científico relacionado a esses problemas no Brasil, o que justifica o presente estudo.

### **3.2. Objetivo Geral**

Associar a presença e contagens de *Clostridium* sulfito redutor e *Clostridium perfringens* em carne bovina embalada a vácuo com a deterioração *blown pack*, considerando diferentes temperaturas de conservação.

### **3.3. Objetivos Específicos**

- ✓ Detectar a presença de *Clostridium* sulfito redutor e *Clostridium perfringens* em carne bovina embalada a vácuo.
- ✓ Comparar a população de *Clostridium* sulfito redutor e *Clostridium perfringens* em carne bovina embalada a vácuo em temperatura de refrigeração (4 °C) e temperatura inadequada de armazenamento (15 °C) durante o período de 28 dias.
- ✓ Associar a deterioração *blown pack* em carne bovina refrigerada embalada a vácuo em temperatura de refrigeração (4 °C) e temperatura inadequada de armazenamento (15 °C) durante o período de 28 dias com clostrídios sulfito redutores.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Coleta de amostras**

De setembro a novembro de 2021 foram obtidas 10 amostras de carne bovina (acém bovino) refrigeradas e embaladas a vácuo, provenientes de um frigorífico localizado no estado de Minas Gerais, Brasil. As informações sobre cada amostra coletada estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Amostras de carne bovina resfriada sem osso embaladas a vácuo analisadas.

<b>Amostra</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Fabricação (Data)</b>	<b>Validade (Data)</b>	<b>Lote</b>	<b>Análise (Data)</b>	<b>Origem</b>
1	6,500	09\09\2021	08\11\2021	090921	16\09\2021	Minas Gerais
2	8,425	11\10\2021	10\12\2021	111021	18\10\2021	Minas Gerais
3	8,425	11\10\2021	10\12\2021	111021	18\10\2021	Minas Gerais
4	8,425	08\10\2021	07\12\2021	081021	18\10\2021	Minas Gerais
5	8,425	08\10\2021	07\12\2021	081021	18\10\2021	Minas Gerais
6	8,820	16\11\2021	16\02\2022	161121	22\11\2021	Minas Gerais
7	8,820	16\11\2021	16\02\2022	161121	22\11\2021	Minas Gerais
8	8,820	16\11\2021	16\02\2022	161121	22\11\2021	Minas Gerais
9	8,820	16\11\2021	16\02\2022	161121	22\11\2021	Minas Gerais
10	8,820	16\11\2021	16\02\2022	161121	22\11\2021	Minas Gerais

#### **4.2. Local do experimento**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (InsPOA) e no Laboratório de Biologia Molecular (Biomol) do Departamento de Veterinária (DVT) e no Laboratório de Embalagens de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), todos localizados na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

#### **4.3. Processamento das amostras**

As amostras foram transportadas em caixa isotérmica até o InsPOA. Após assepsia com álcool 70%, cada amostra foi fracionada em nove bags estéreis (400 g cada), as quais foram novamente embaladas a vácuo.

Essas amostras foram submetidas a duas temperaturas de armazenamento (4 °C e 15 °C) por 28 dias, com análise nos dias 7, 14, 21 e 28. Para controle, uma fração de cada amostra era analisada no primeiro dia (dia 0).

#### 4.4. Análise das amostras

##### 4.4.1. Preparação das amostras

25 gramas de cada bag foi pesada assepticamente e homogeneizada com 225 mL de *Buffered Peptone Water* (BPW) (*Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA*) em *Seward Stomacher® 400 Circulator* (*Seward™ Ltd., USA*) durante dois minutos. Em seguida foi realizada a diluição seriada em tubos contendo 9 mL de BPW.

##### 4.4.2. Inoculação, incubação, contagem e isolamento de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*

Para a contagem e isolamento de clostrídios sulfito redutores foi utilizado o Método de plaqueamento APHA 33.72:2015, da *American Public Health Association*, utilizado para contagem de clostrídios sulfito redutores em alimentos destinados ao consumo humano, descrito na 5ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Labbe, 2015).

Para a contagem e isolamento de *C. perfringens* foi utilizado o Método de plaqueamento ISO 7937:2004, da *International Organization for Standardization*, utilizado para contagem de *C. perfringens* em alimentos destinados ao consumo humano, descrito na 5ª Edição do Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água (Silva et al., 2017).

Cinco diluições (1 mL) adequadas de cada amostra (*bag*) foram inoculadas em ágar *Tryptose Sulfite Cycloserine* (TSC): Ágar *Clostridium perfringens* (*Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England*) adicionado de Suplemento para *Clostridium* (*D-cycloserine* na concentração de 0,04%) (*Oxoid Ltd.*), seguidos por plaqueamento em profundidade (*pour plate*) e subsequente aplicação de uma sobrecamada. Depois da completa solidificação, as placas foram armazenadas em jarras de anaerobiose sem invertê-las e incubadas a 37 °C por 18-24 horas. Para obtenção da anaerobiose foram utilizados geradores de anaerobiose (*BD GasPak™ EZ*) (*Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA*). O método ISO 7932:2004 para contagem de *C. perfringens* em alimentos especifica o plaqueamento em duplicata, mas a ISO 7218:2007/Amd 1:2013 dispensa o plaqueamento em duplicata quando é feito a inoculação de pelo menos duas diluições.

Após o período de incubação foram realizadas as contagens das colônias presuntivas de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*. Foram selecionadas as placas contendo até 200 colônias e realizadas as contagens das colônias típicas, que são caracterizadas por serem pretas. Os resultados foram expressos em  $\log_{10}$  UFC/g. Paralelamente a contagem, foram selecionadas até dez colônias típicas de cada placa selecionada. As colônias foram inicialmente estriadas em ágar TSC para purificação (incubação a 37 °C/18-24 horas). Após o período de incubação, as colônias típicas isoladas foram transferidas para tubos contendo *Thioglycollate Medium* U.S.P (TGM) (*Oxoid Ltd.*), incubados a 37 °C por 18-20 horas para posterior confirmação bioquímica.

#### **4.4.3. Confirmação de clostrídios sulfito redutores**

Para confirmação dos clostrídios sulfito redutores foi determinado a morfologia e a coloração de Gram dos isolados. O método utilizado para a coloração de Gram consistiu no tratamento por imersão do esfregaço bacteriano em Violeta Fenicada Seg.Gram (cristal violeta) (Êxodo Científica, Sumaré, São Paulo, Brasil) por dois minutos seguido de lavagem da lâmina em água corrente, tratamento por imersão em Lugol Seg.Gram (Êxodo Científica) por um minuto seguido de lavagem da lâmina em água corrente, retirada do excesso do primeiro reagente com Álcool Acetona Seg Gram (Êxodo Científica) seguido de lavagem da lâmina em água corrente e tratamento final por imersão em Solução Fucsina Fenicada de Gram (Êxodo Científica) por 30 segundos seguido de lavagem da lâmina em água corrente.

Os isolados determinados como bastonetes Gram positivos foram confirmatórios para clostrídios sulfito redutores. O cálculo dos resultados foi baseado em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas, sendo expresso em  $\log_{10}$  UFC/g.

#### **4.4.4. Confirmação de *Clostridium perfringens***

Para confirmação de *C. perfringens* foram realizados os testes de fermentação da lactose, hidrólise da gelatina, redução do nitrato a nitrito e motilidade. Cada isolado foi inoculado nos seguintes meios previamente preparados:

*Motility Nitrate Medium* (Merck Millipore) adicionado de Glicerol (Éxodo Científica) na concentração de 0,5% e *Lactose Gelatin Medium* (Base) (Merck Mellipore) adicionado de *gelatine 180 Bloom* (*Gelatin from porcine skin*) (Merck Mellipore) na concentração de 12%.

#### **4.4.4.1. Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina**

Com uma alça bacteriológica, cada isolado foi inoculado em tubos contendo *Lactose Gelatin Medium* e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, para o teste de fermentação da lactose foi observado se houve a formação de bolhas no tubo e a viragem ácida do indicador (vermelho de fenol). Em caso da alteração da cor do meio de vermelho para amarelo, foi considerado positivo e quando a cor do meio permaneceu inalterada, negativo. Já para o teste de hidrólise da gelatina, os tubos foram transferidos para uma geladeira (5 °C) e mantidos sob refrigeração por 1 hora. Logo após, foi observado se o meio permaneceu líquido, sendo considerado positivo e quando o meio adquiriu uma consistência firme, negativo.

#### **4.4.4.2. Teste de redução de nitrato a nitrito e teste de motilidade**

Com uma agulha de inoculação, cada isolado foi inoculado por picada no centro dos tubos contendo *Motility Nitrate Medium* até uma profundidade distante 1 cm do fundo do tubo e incubados a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, para o teste de motilidade foi observado se houve migração do isolado para regiões fora da linha de inoculação, sendo considerado positivo e quando o crescimento do isolado restringiu-se à região da picada da agulha de inoculação, negativo.

Para o teste de redução de nitrato a nitrito, foram adicionados aos tubos os seguintes reagentes de nitrato: *Nitrate Reagent A* (solução 0,5% de alfa-naftol) (Merck Mellipore) e *Nitrate Reagent B* (solução 0,8% de ácido sulfanílico) (Merck Mellipore). Foi observado imediatamente se houve um desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura, sendo considerado positivo e quando não houve alteração da cor, negativo. No caso de teste negativo, foi adicionado uma pitada de pó de zinco ao tubo e observado se houve alteração da cor, sendo que, quando o

meio permaneceu com a cor inalterada (indicativo de nitrato ausente) o teste foi considerado positivo e quando o meio adquiriu uma cor vermelha (indicativo de nitrato presente), negativo.

#### **4.4.4.3. Cálculo dos resultados**

Foram considerados como *C. perfringens* todos os isolados com as seguintes características: teste de fermentação da lactose (+), hidrólise da gelatina (+), redução de nitrato a nitrito (+) e motilidade (-). O cálculo dos resultados foi baseado em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas, sendo expresso em  $\log_{10}$  UFC/g.

#### **4.4.5. Análise estatística**

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando o teste F para comparação de médias a 5% de probabilidade com o intuito de avaliar se existe diferença significativa entre a contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*, contagem de clostrídios sulfito redutores e contagem de *C. perfringens* em relação às temperaturas de armazenamento (4 °C e 15 °C); além de avaliar se existe diferença significativa entre a contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores em relação ao tempo de contagem das placas (24 e 72 horas). Para todas as análises estatísticas foi utilizado o pacote estatístico R [R versão 4.0.3 (2020-10-10)].

#### **4.4.6. Estocagem dos isolados**

Após a confirmação como clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*, os isolados foram estocados a – 20 °C em caldo TGM adicionado de glicerol a 15%.

#### **4.4.7. Identificação molecular dos isolados**

##### **4.4.7.1. Extração do DNA**

Isolados identificados como clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* nas etapas anteriores foram submetidos a extração do DNA genômico. O método de extração por fervura foi adotado, considerando as seguintes etapas: 1 - alíquota de

500 µl do isolado incubado em TGM (37 °C / 24 horas) foi transferido para um eppendorf (1,5 mL), seguiu para centrifugação a 10.000 RPM por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado; 2 - adição e homogeneização de 500 µl de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (pH 7.2), seguido de centrifugação a 10.000 RPM por cinco minutos e descarte do sobrenadante; 3 - adição e homogeneização de 100 µl de água MilliQ (Ultrapura) e 100 µl de BT *Chelex® 100 Resin* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, USA*) a 5%, seguido de fervura a 100 °C por 20 minutos e centrifugação a 10.000 RPM por sete minutos; 4 - o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf (1,5 mL) e estocado em freezer a – 20 °C.

#### **4.4.7.2. Identificação molecular de *Clostridium spp.***

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para a identificação de *Clostridium spp.* do Grupo I (*Clostridium* cluster I), seguindo protocolo descrito por Song et al. (2004). As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µl, sendo 12,5 µl da *GoTaq® Green Master Mix* (2X *Green GoTaq® Reaction Buffer* (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP and 3mM MgCl<sub>2</sub>) (*Promega Corporation, Madison, USA*), 0,75 µl de cada primer: CL-F1 (*Forward Primer: TACCAAAGGAGGAAGCCAC*) (*Invitrogen, Waltham, 38 Massachussets, USA*) e CL-R2 (*Reverse Primer: GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT*) (*Invitrogen*) (300 nM), 6,5 µl de *Nuclease-Free Water* (*Promega Corporation*) e 5 µl do DNA genômico extraído.

As amplificações foram realizadas em termociclador modelo *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) seguindo a seguinte programação: um ciclo a 95 °C por dois minutos (desnaturação inicial), seguidos por 45 ciclos a 95 °C por 20 segundos (desnaturação), 63 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 45 segundos (extensão); além de um ciclo a 72 °C por sete minutos (extensão final).

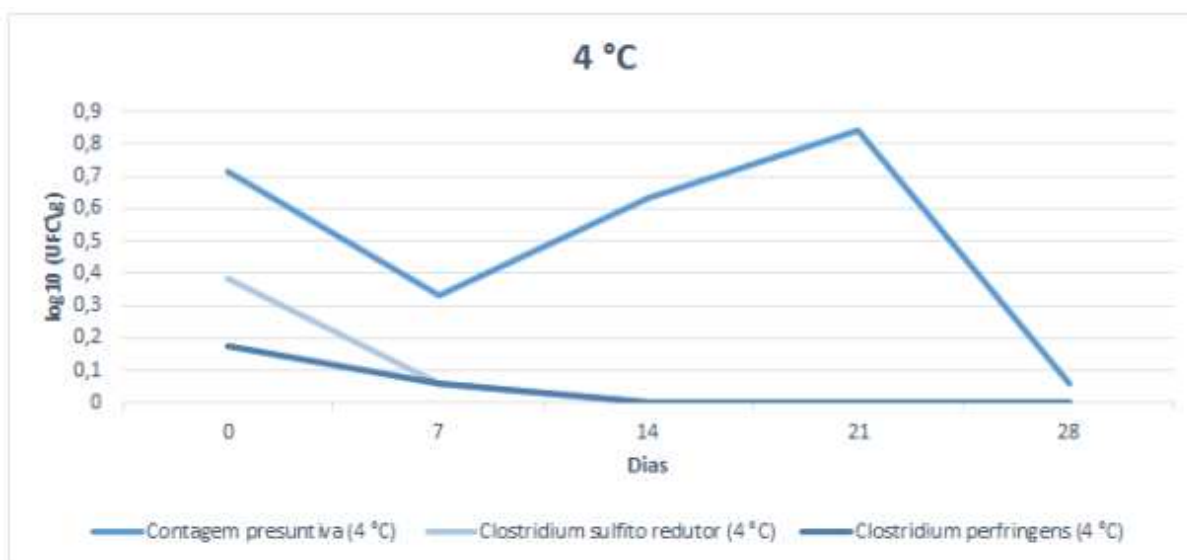
Posteriormente, os produtos das reações seguiram para a eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo 0,2 µl/10 mL de intercalante, utilizando um marcador de 100 pb (100 pb DNA *Ladder*) (*Promega Corporation*), com uma voltagem de 80 V durante cerca de 50 minutos. Por fim, foram submetidas à luz ultravioleta e as imagens visualizadas e captadas em *Transilluminator L – PIX* (*Loccus*).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Contagem de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*

As informações sobre as contagens de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* estão apresentadas nas Tabelas 2, 3 e 4, e nos Gráficos 1 e 2. Nas amostras armazenadas a 4 °C visualizamos o pico da contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* com 21 dias de estocagem e decaindo após esse período (Tabela 2 e Gráfico 1). Após o isolamento das colônias típicas e confirmação por testes bioquímicos, foi identificado que a população de clostrídios sulfito redutores nas amostras armazenadas a 4 °C foram mais elevadas no dia 0 (0,4 log<sub>10</sub> UFC/g), após 7 dias de armazenamento houve uma redução e nos demais tempos estudados não foi detectada a presença de clostrídios sulfito redutores (Tabela 3 e Gráfico 1). Uma tendência similar foi observada para *C. perfringens* nas amostras armazenadas a 4 °C (Tabela 4 e Gráfico 1).

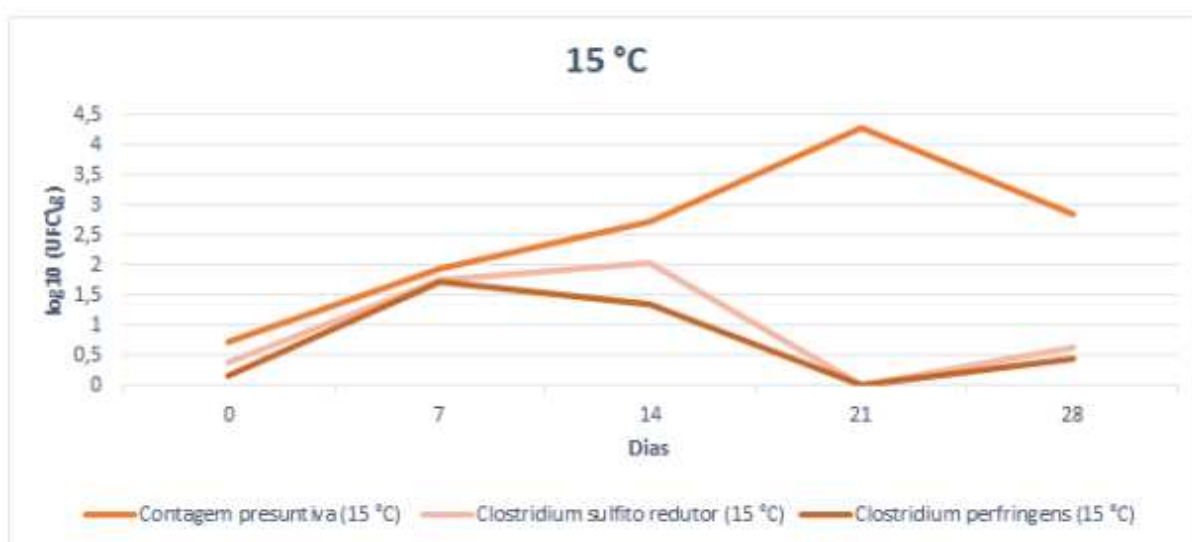
**Gráfico 1:** Contagens de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* das amostras armazenadas a 4 °C durante 28 dias de estocagem.



Já as amostras armazenadas a 15 °C apresentaram contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* crescente durante o armazenamento, no dia 21 foi obtida a maior contagem, em seguida uma redução significativa foi

constatada no dia 28 (Tabela 2 e Gráfico 2). Após o isolamento das colônias típicas e confirmação por testes bioquímicos, as contagens de clostrídios sulfito redutores a 15 °C foram mais elevadas nos dias 7 e 14, uma redução significativa foi observada em seguida (Tabela 3 e Gráfico 2). Em relação a *C. perfringens* a 15 °C, foi identificado um aumento da contagem entre o dia 0 e o dia 7, em seguida foi observada uma tendência de redução da população, que se manteve similar ao observado no tempo 0 após 28 dias de armazenamento (Tabela 4 e Gráfico 2).

**Gráfico 2:** Contagens de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* das amostras armazenadas a 15 °C durante 28 dias de estocagem.



**Tabela 2:** Influência da temperatura de armazenamento nas médias das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*.

Temperatura de incubação	Contagem (log <sub>10</sub> – UFC/g)				
	D0	D7	D14	D21	D28
4 °C	0,72	0,34	0,64	0,84	0,06
15 °C	0,72	1,94	2,74	4,28	2,84

Valores são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por ANOVA (  $F = 56.740$ ,  $p = 0.0000$ ).

**Tabela 3:** Influência da temperatura de armazenamento nas médias das contagens de clostrídios sulfito redutores.

Temperatura de incubação	Contagem ( $\log_{10}$ – UFC/g)				
	D0	D7	D14	D21	D28
4 °C	0,39	0,06	0	0	0
15 °C	0,39	1,77	2,03	0	0,62

Valores são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por ANOVA (  $F = 14.292$ ,  $p = 0.00026906$ ).

**Tabela 4:** Influência da temperatura de armazenamento nas médias das contagens de *C. perfringens*.

Temperatura de incubação	Contagem ( $\log_{10}$ – UFC/g)				
	D0	D7	D14	D21	D28
4 °C	0,18	0,06	0	0	0
15 °C	0,18	1,74	1,37	0	0,44

Valores são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por ANOVA (  $F = 11.948$ ,  $p = 0.0008104$ ).

Portanto, em relação à contagem de *Clostridium* sulfito redutor, observamos que a 4 °C obtivemos uma contagem média máxima de 0,39  $\log_{10}$  UFC/g e a 15 °C uma contagem média máxima de 2,03  $\log_{10}$  UFC/g em todo o período analisado, além de constatar que a temperatura de armazenamento influenciou significativamente ( $p < 0.05$ ) na população de clostrídios sulfito redutores. Furlanetto et al. (2020) analisam a contagem de *Clostridium* sulfito redutor em carne bovina (acém) resfriada embalada a vácuo durante 120 dias em temperatura controlada a 0°C e demonstram que todas as análises tiveram um resultado inferior a  $1,0 \times 10$  UFC/g (1  $\log_{10}$  UFC/g) em todos os períodos avaliados. Logo, podemos concluir que os resultados do nosso estudo estão de acordo quando comparado com as análises em temperatura de refrigeração; já em relação a temperatura inadequada de

armazenamento, não encontramos parâmetros comparativos, mas a contagem superior é esperada devido ao aumento da temperatura. Lembrando que para contagem de clostrídios sulfito redutores não há padrões estabelecidos na legislação nacional em vigor para estes microrganismos e essa análise serve como indicativo da presença de *C. perfringens* no alimento.

Em relação a contagem de *C. perfringens*, observamos que a 4 °C obtivemos uma contagem média máxima de 0,18 log<sub>10</sub> UFC/g e a 15 °C uma contagem média máxima de 1,74 log<sub>10</sub> UFC/g em todo o período analisado, além de constatar que a temperatura de armazenamento influenciou significativamente ( $p < 0.05$ ) na população de *C. perfringens*. Para método de comparação, Cosansu et al. (2021) demonstrou que os níveis médios de contaminação por *C. perfringens* nos grupos amostrais que analisou variou de 1,5 a 8,3 x 10<sup>2</sup> UFC/g (1,92 a 2,18 log<sub>10</sub> UFC/g), sendo que a maior contagem foi em um corte cárneo derivado de carne bovina. Logo, podemos concluir que a refrigeração adequada impedirá a multiplicação exacerbada desses microrganismos, ou que a população estabiliza ou diminui lentamente, como também já foi observado por Juneja et al. (1994).

Com 21 dias de estocagem, ambas as temperaturas apresentaram contagem de 0 log<sub>10</sub> UFC/g, embora as contagens presuntivas apresentassem valores consideráveis, sendo a 4 °C: 0,84 log<sub>10</sub> UFC/g e 15 °C: 4,28 log<sub>10</sub> UFC/g. Isso deve-se pelo fato de que nenhum isolado foi obtido no 21º dia de estocagem para posterior confirmação bioquímica.

Os microrganismos psicotróficos, como *Clostridium spp.*, parecem ser o maior desafio para a estabilidade microbiológica de carnes resfriadas embaladas a vácuo; este fato pode estar relacionado à capacidade de produção de esporos por esses microrganismos (Mesquita, 2014). A esporulação desses microrganismos podem ocorrer devido às condições não favoráveis para sua multiplicação. Além disso, a contagem de microrganismos anaeróbicos pode ser enganosa e não representar *Clostridium spp.* em carnes deterioradas (Broda et al., 1996), como pode ter ocorrido nas amostras do presente estudo, onde várias apresentaram a deterioração *blown pack* durante o período analisado.

Outro ponto a ser abordado são as dificuldades com a enumeração e o isolamento de microrganismos psicotróficos utilizando métodos de cultura, que podem ser devido a um possível efeito antagônico das bactérias lácticas. Esse efeito também pode ocorrer naturalmente na carne durante o armazenamento a baixas

temperaturas, causando inibição das espécies de *Clostridium spp.* por bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (Crandall e Montville, 1993; Broda et al., 1996).

A supressão desses microrganismos também podem ocorrer pelo efeito da toxicidade do butanol. Quando a fonte de carbono se torna limitante após o armazenamento prolongado da carne, alguns clostrídios podem mostrar uma sensibilidade aumentada ao butanol em concentrações que normalmente não são tóxicas (Cortinas et al., 1994). A competição é um bom indicativo, visto que foi observado uma quantidade exacerbada de colônias não típicas aos 21 dias nas placas. Potencial de oxirredução e acidez também são fatores que podem influenciar na queda da população durante o período analisado. A contagem constatada no 28º de estocagem pode ser explicada pela possível adaptação desses microrganismos às condições em que foram submetidos.

Dentre as 10 amostras, apenas das amostras 1, 2 e 5 não foi possível o isolamento e identificação bioquímica de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens*. Isso deve-se pelo fato de que as colônias características foram isoladas seguindo os protocolos da APHA 33.72:2015 (clostrídios sulfito redutores) e da ISO 7937:2004 (*C. perfringens*), somente das placas com até 200 colônias características; e como essas amostras apresentaram contagens de 0 log<sub>10</sub> UFC/g em todos os dias analisados nas primeiras 24 horas de incubação das placas, não foi possível o isolamento. Esses resultados foram consistentes em todo o período de estocagem das amostras, com exceção do dia 21, que embora tenha apresentado contagem em todas as amostras, nenhuma colônia característica foi isolada e confirmada como *Clostridium spp.*

Coşansu et al. (2021) realizam um estudo em que foram analisadas 101 amostras de carne originadas da Turquia em relação à incidência e contaminação por *C. perfringens*; 48 amostras (47,5%) estavam contaminadas e a maior incidência deste patógeno foi determinada em amostras de dois cortes cárneos derivados de carne bovina, *ground beef* (61,3%) e *meatball* (72,2%). Başkaya et al. (2004) determinam a presença de microrganismos anaeróbicos redutores de sulfito em 20 das 27 amostras (74%) de carne bovina analisadas. De acordo com as informações apresentadas no estudo de Guran et al. (2014), 92% das amostras de carne bovina analisadas estavam contaminadas por *C. perfringens*. Em um estudo conduzido por Jiang et al. (2021), no qual analisam 221 amostras de carne bovina coletadas na China quanto a presença de *C. perfringens*, utilizando métodos de cultura

bacteriana, foi constatado a presença deste patógeno em 53 amostras (23,98%). Ghoneim e Hamza, (2017) indicam a presença de *C. perfringens* isolados de carne bovina adquirida de frigoríficos em 52,9% das amostras analisadas. Conforme apresentado por Kamber et al. (2007), 18% das 96 amostras de carne bovina analisadas para ocorrência de *C. perfringens* estavam contaminadas. Hassani et al. (2022) obteve uma taxa de prevalência de *C. perfringens*, isolados usando métodos baseados em cultura, em amostras de carne bovina de 13,53% (18 de 133). Outros estudos com menor prevalência também detectaram *C. perfringens* em amostras de carne bovina na Coreia (10%) utilizando métodos baseados em cultura (Jang et al., 2020), carne bovina na Nigéria (3,5%) (Tizhe et al., 2015) e carcaças bovinas na Coreia (3,3%) (Chae et al., 2006).

No Brasil, Poty, et al. (2018) realizam a pesquisa de *C. perfringens* em carnes bovinas embalada a vácuo comercializadas no Distrito Federal e detectam a presença deste microrganismo em todas as amostras (54) analisadas; neste estudo, foi utilizada uma etapa de pré-enriquecimento e posteriormente utilizou-se o método de cultura em ágar TSC. Essas diferenças de prevalência podem ser decorrentes de fortes variações nas condições higiênicas e sanitárias do manuseio, processamento e distribuição dos produtos. A inspeção de frigoríficos e toda a cadeia produtiva da carne bovina, a educação do consumidor e a adoção de medidas de controle e prevenção por parte das indústrias alimentícias são medidas que oferecem oportunidades para melhorar o manuseio dos alimentos e minimizar a contaminação em toda a cadeia produtiva. Identificar os focos e os fatores associados à contaminação podem levar a medidas de controle que diminuiriam a contaminação desses produtos. Portanto, consideramos que os estudos dessa pesquisa podem proporcionar uma melhor compreensão do risco que este patógeno pode causar, visto que está associado a diversos surtos de doenças transmitidas por alimentos.

## **5.2. Isolamento e confirmação bioquímica de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens***

Dos 213 isolados típicos, 213 (100%) foram confirmados como clostrídios sulfito redutores e 170 (79,8%) foram confirmados como *C. perfringens*. Em relação as colônias confirmadas bioquimicamente como clostrídios sulfito redutores podemos considerar como um ponto positivo da metodologia aplicada, visto que

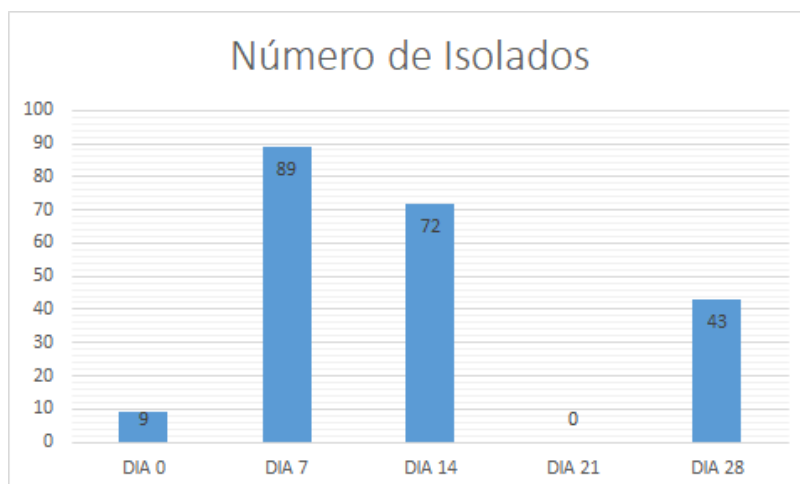
100% das colônias presuntivas foram confirmadas. Já em relação as colônias confirmadas bioquimicamente como *C. perfringens*, observamos que 79,8% das colônias presuntivas foram confirmadas.

Coçansu et al., (2021) realizou um estudo em que as colônias típicas de *C. perfringens* foram cultivadas anaerobicamente em ágar TSC, como no nosso estudo, e confirmadas por testes bioquímicos; 13 das 101 amostras (12,9%) produziram colônias típicas no ágar TSC, mas não foram confirmadas como *C. perfringens* nos testes bioquímicos. Como visto, é um resultado similar ao identificado no presente estudo, onde 20,2% das colônias presuntivas também não foram confirmadas nos testes bioquímicos. Este resultado não surpreende, considerando que a especificidade do meio de cultura utilizado no estudo (TSC) já foi estimado em 74,5% e outras espécies de *Clostridium spp.* foram isoladas com frequência (Fischer et al., 2002).

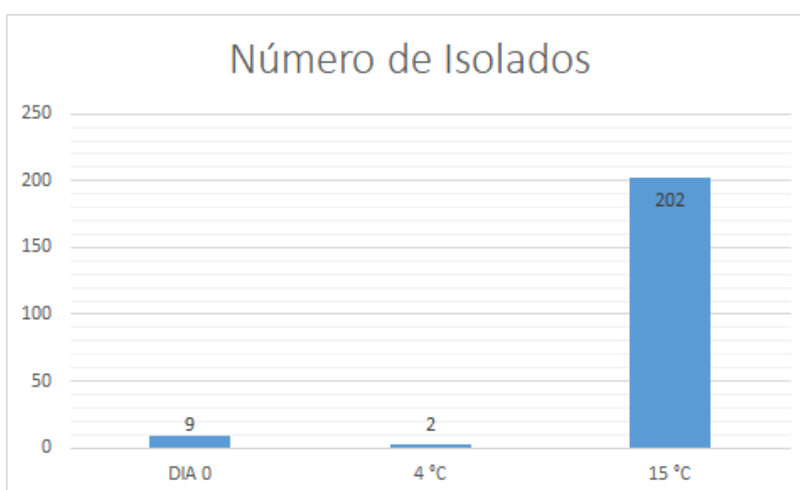
Além disso, a eletividade desse meio de cultura baseia-se na redução do sulfito, que precipita o sulfeto de ferro, resultando em colônias pretas; entretanto, essa reação não se limita aos clostrídios e outras bactérias como *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Eschericia freundii*, *Paracolobactrum spp.* e certas espécies dos gêneros *Erwinia*, *Flavobacterium*, e *Achromobacter* também podem reduzir o sulfito, resultando em colônias negras (Angelotti et al., 1962).

Em relação ao dia de estocagem das amostras, desses 213 isolados, 9 foram isolados das amostras do dia 0, 89 foram isolados das amostras do dia 7, 72 foram isolados das amostras do dia 14, nenhum isolado foi obtido das amostras do dia 21 e 43 foram isolados das amostras do dia 28 (Gráfico 3). Em relação à temperatura de armazenamento das amostras, 9 foram isolados das amostras do dia 0, 2 foram isolados das amostras armazenadas à 4 °C e 202 foram isolados das amostras armazenadas à 15 °C (Gráfico 4).

**Gráfico 3:** Número de isolados em relação ao dia de incubação das amostras.



**Gráfico 4:** Número de isolados em relação à temperatura de armazenamento das amostras.



### 5.3. Deterioração *blown pack*

Paralelamente ao estudo abordado anteriormente, obtivemos o surgimento da deterioração *blown pack* em amostras de carne bovina embalada a vácuo armazenadas a temperatura inadequada de 15 °C. Geralmente essa deterioração está associada a microrganismos da Família Enterobacteriaceae, das bactérias lácticas e principalmente dos clostrídios psicrotróficos, psicrotolerantes e psicrófilos. Considerando isso, as contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores obtidas no atual estudo (com 24 horas de incubação) foram relacionadas com o surgimento da deterioração *blown pack*. Alternativamente, as contagens presuntivas de

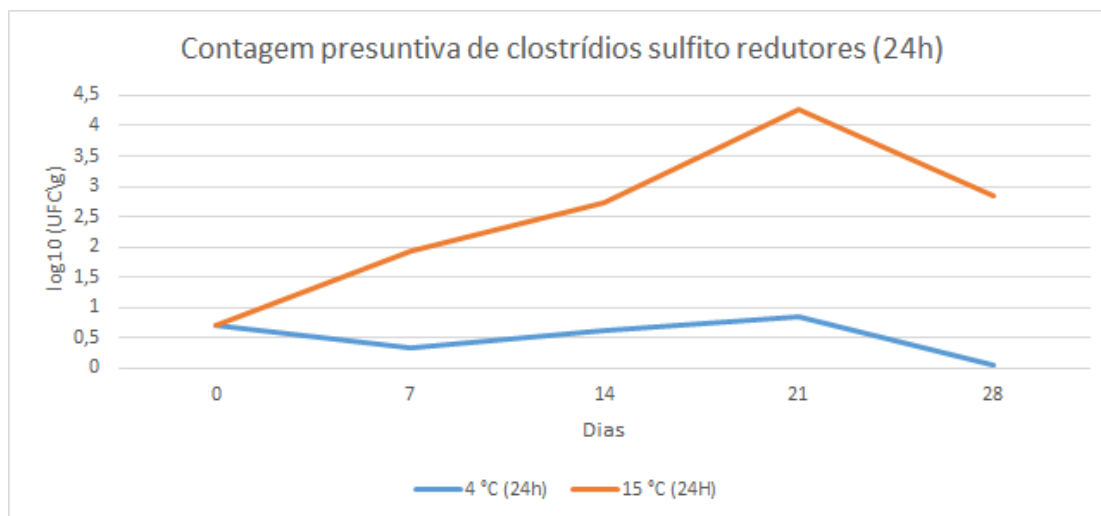
clostrídios sulfito redutores foram mantidas até as 72 horas de incubação (Gráfico 6), como o objetivo de aprofundar mais o estudo. As informações sobre as contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores estão apresentadas na Tabela 5 e Gráficos 5, 6, 7 e 8.

Em relação a contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores das placas incubadas por 24 horas e amostras armazenadas a 4 °C visualizamos o pico da contagem presuntiva com 21 dias de incubação e decaindo após esse período. Já as amostras incubadas a 15 °C apresentaram contagem crescente durante o armazenamento, no dia 21 foi obtida a maior contagem, em seguida uma redução significativa foi constatada no dia 28 (Tabela 5 e Gráfico 5).

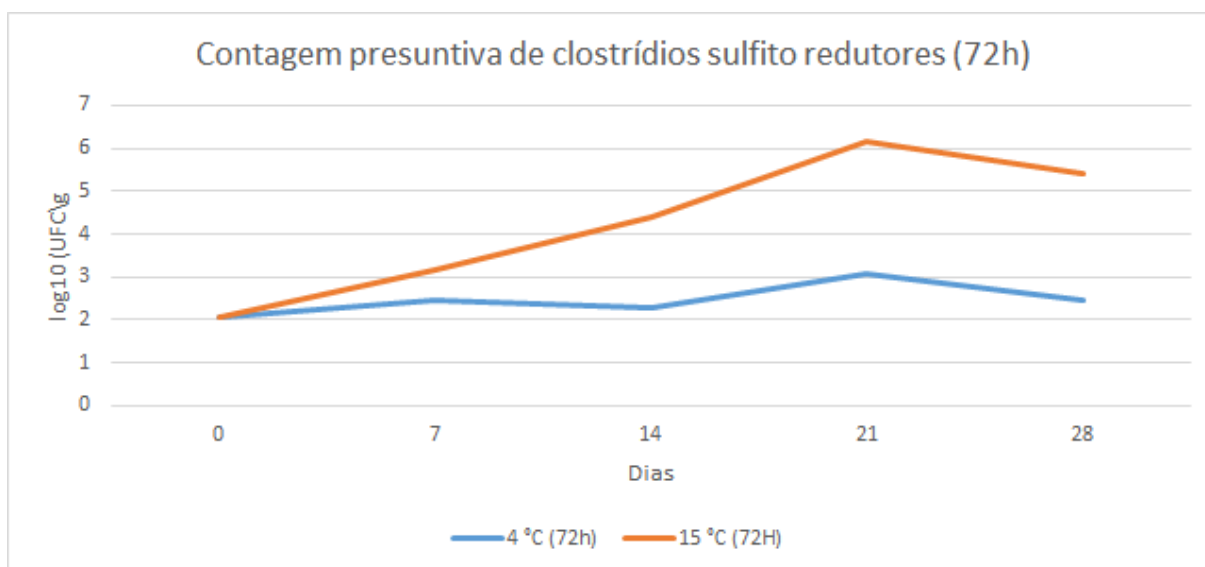
Em relação a contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores das placas incubadas por 72 horas (Gráfico 6), tanto das amostras armazenadas a 4 °C quanto a 15 °C, observamos um padrão similar a contagem de 24 horas. Entretanto, observamos um aumento considerável das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores das placas após 72 horas de incubação (Tabela 5 e Gráfico 6), apresentando uma média de 2,14 log<sub>10</sub> UFC/g a mais na contagem das amostras incubadas a 4 °C e uma média de 1,66 log<sub>10</sub> UFC/g a mais na contagem das amostras incubadas a 15 °C quando comparado com as contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores das placas após 24 horas de incubação (Tabela 5 e Gráficos 7 e 8).

De acordo com análise estatística realizada para avaliar a influência do tempo de incubação das placas (24 e 72 horas) e a influência da temperatura de armazenamento das amostras (4 °C e 15 °C) nas contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores, constatamos que ambas as análises das contagens foram significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Tabela 5).

**Gráfico 5:** Contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores realizada com 24 horas de incubação.



**Gráfico 6:** Contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores realizada com 72 horas de incubação.

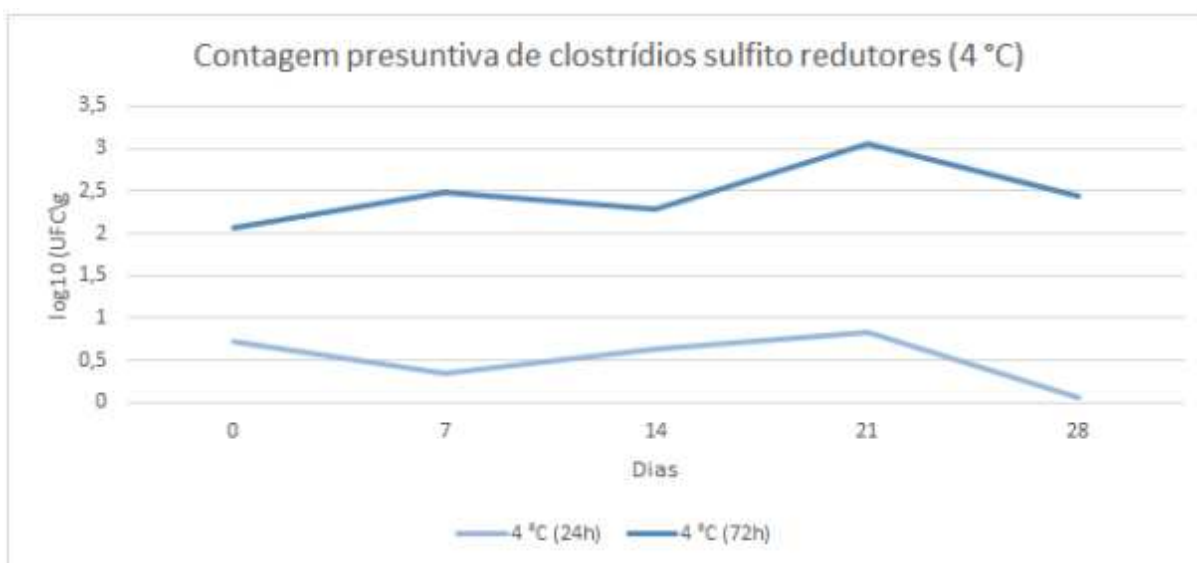


**Tabela 5:** Influência do tempo de incubação das placas (24 e 72 horas) e da temperatura de armazenamento das amostras (4 °C e 15 °C) nas médias das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores.

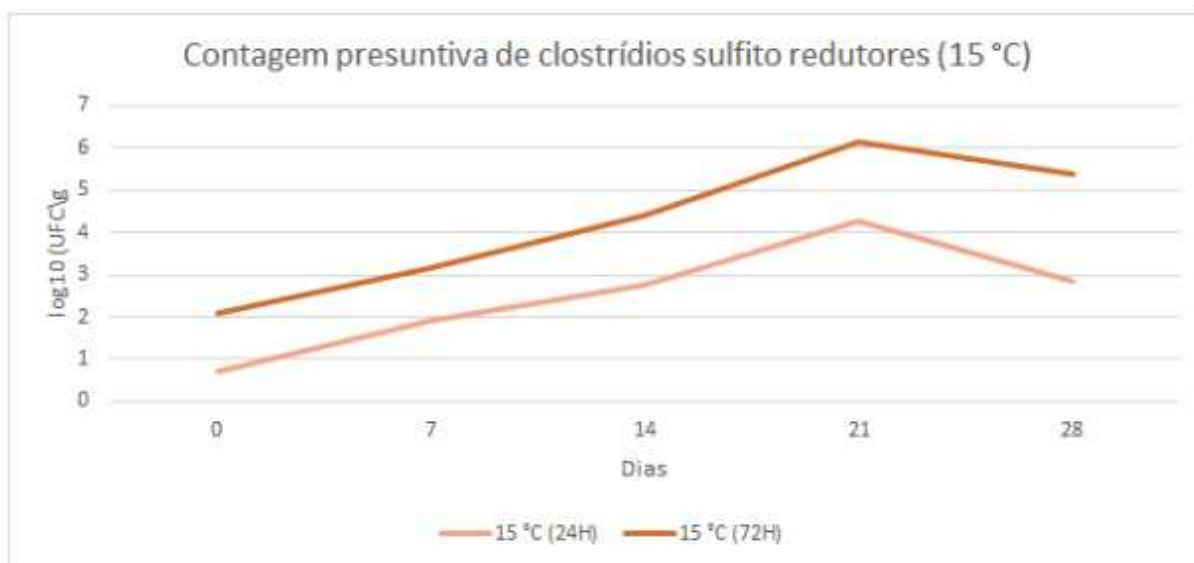
Incubação das placas	Temperatura de armazenamento	Contagem (log <sub>10</sub> – UFC/g)				
		D0	D7	D14	D21	D28
24 h	4 °C	0,72	0,34	0,64	0,84	0,06
	15 °C	0,72	1,94	2,74	4,28	2,84
72h	4 °C	2,07	2,48	2,28	3,06	2,43
	15 °C	2,07	3,15	4,4	6,15	5,41

Influência do tempo de incubação das placas (24 e 72 horas): valores são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por ANOVA ( $F = 54.620$ ,  $p = 0.0000$ ). Influência na temperatura de armazenamento das amostras (4 °C e 15 °C): valores são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por ANOVA ( $F = 56.740$ ,  $p = 0.0000$ ).

**Gráfico 7:** Comparação das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores (24 e 72 horas) das amostras armazenadas a 4 °C.



**Gráfico 8:** Comparação das contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores (24 e 72 horas) das amostras armazenadas a 15 °C.



No dia da aquisição e processamento das amostras, todas elas estavam dentro do prazo de validade e não mostravam sinais de deterioração. Das 10 amostras analisadas, nenhuma das armazenadas a 4 °C desenvolveu a deterioração *blown pack* durante os 28 dias de estocagem (Figuras 1 e 2). Em relação às amostras armazenadas a 15 °C, 9 (90%) desenvolveram a deterioração *blown pack* (Figuras 3, 4 e 5) em algum momento dos 28 dias de estocagem, sendo que as amostras 2, 3, 4, 5 e 9 desenvolveram entre o 15° e 28° dia e as amostras 6, 7, 8 e 10 desenvolveram entre o 8° e 28° dia.

Dentre os resultados obtidos podemos concluir que o abuso da temperatura (15 °C) no armazenamento das carnes foi crucial para o surgimento da deterioração *blown pack*, visto que as amostras armazenadas na temperatura de refrigeração (4°C) não causaram a distensão das embalagens até o 28° dia, embora apresentassem uma média na contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores de 3,06 log<sub>10</sub> UFC/g no pico das contagens, com 21 dias de estocagem. No entanto, considerando os resultados obtidos, analisamos que as amostras com a deterioração *blown pack* tiveram uma média de 6,19 log<sub>10</sub> UFC/g na contagem presuntiva de clostrídios sulfito redutores quando foi constatado o surgimento da deterioração. Nesse caso, observamos que há diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre essas contagens (Tabela 5).

As contagens obtidas nas amostras armazenadas a 4 °C não foram suficientes para causar a deterioração *blown pack* durante o período analisado no estudo. Desta forma, podemos definir que a temperatura de refrigeração, mesmo que não impeça a multiplicação de microrganismos deteriorantes, pode retardar o aparecimento da deterioração *blown pack*. Considerando os estudos científicos consultados, não foram identificadas pesquisas onde amostras de carne bovina embalada a vácuo não inoculadas com microrganismos deteriorantes causadores da deterioração *blown pack* foram estocadas a temperatura de refrigeração (4 °C) e temperatura inadequada de armazenamento (15 °C). No entanto, foram identificados alguns estudos em que amostras de carne bovina embalada a vácuo foram inoculadas com espécies de *Clostridium* psicotróficos para avaliação do surgimento da deterioração *blown pack*.

Kalchayanand et al. (1989) demonstram que as amostras inoculadas com espécies de *Clostridium* psicotróficos acumularam gás em uma semana armazenadas entre 1 °C e 3 °C, enquanto as amostras de controle não apresentaram produção de gás mesmo após o período de 12 semanas. Silva et al. (2012) demonstram a capacidade de algumas cepas de clostrídios psicotróficos, isoladas de carnes embaladas a vácuo e ambientes de abatedouro, em causar a deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo armazenadas em temperatura inadequada de armazenamento (15 °C) e temperatura de refrigeração (2 °C). O tempo dos primeiros sinais de distensão das embalagens variou, dependendo da cepa bacteriana inoculada. A deterioração ocorreu dentro de 3 a 8 semanas em quase todos os casos nas amostras armazenadas a 15 °C. Nas amostras armazenadas a 2 °C, a taxa de deterioração foi reduzida consideravelmente. Nas amostras inoculadas com *C. estertheticum subsp. estertheticum*, por exemplo, os primeiros sinais de distensão das embalagens foram observados após 4 e 15 dias de armazenamento a 15 °C e 2 °C, respectivamente. Além disso, a deterioração *blown pack* não foi observada nas embalagens de controle negativo armazenadas a 2 °C. Por outro lado, foram observados sinais de deterioração nas amostras de controle negativo armazenadas a 15 °C após 6 semanas. Nesse ponto, o controle utilizado neste trabalho, sem inoculação de microrganismos deteriorantes, é similar ao presente estudo, com ação apenas da microbiota natural. Porém, a deterioração surgiu em tempo

consideravelmente maior, visto que no presente estudo foi observada entre 7 e 21 dias de armazenamento a 15 °C.

Em relação à contagem de clostrídios sulfito redutores em amostras de carne bovina embalada a vácuo com a deterioração *blown pack* não temos estudos para método de comparação. No entanto, Silva et al. (2011) analisam cortes de carne bovina embalada a vácuo com e sem a deterioração *blown pack*, originados do estado de São Paulo (Brasil), em relação a contagem de microrganismos psicrotróficos anaeróbicos. Nas amostras contendo a deterioração *blown pack* obteve contagens de até 10,74 log<sub>10</sub> UFC/g e nas amostras sem deterioração obteve contagens de até 4,60 log<sub>10</sub> UFC/g. Com esses resultados, foi demonstrado que *Clostridium* psicrotrófico pode representar um risco para a estabilidade da carne bovina embalada a vácuo produzida em países tropicais, mesmo durante a vida útil do produto (Silva et al., 2011). Em nosso estudo, as contagens presuntivas de clostrídios sulfito redutores atingiram até 5,05 log<sub>10</sub> UFC/g em uma das amostras sem o surgimento da deterioração *blown pack*. Por outro lado, obteve contagens de até 8,26 log<sub>10</sub> UFC/g em uma das amostras com o surgimento da deterioração, sendo significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) (Tabela 5). Reid et al., (2016) demonstram que *Clostridium spp.* multiplicou-se bem em carne bovina embalada a vácuo, atingindo contagens de 5,67 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> a uma temperatura de armazenamento de 2 °C durante o período de 100 dias analisados.

Em relação as características sensoriais, todas as amostras com a deterioração *blown pack* apresentaram características repugnantes, como cor esverdeada, formação de limosidade e odor muito forte (fétido). Além disso, todas essas amostras tiveram uma considerável distensão das embalagens (Figuras 3, 4 e 5). Essas características repugnantes estão de acordo com diversos estudos em que demonstraram o odor fétido e pútrido, a produção de limo e a cor esverdeada como características da deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989; Broda et al., 1996; Clemens et al., 2010; Silva et al., 2011). Além da acentuada distensão das embalagens, considerada a principal característica da deterioração *blown pack*, com a alta produção de gases, principalmente dióxido de carbono e hidrogênio (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989; Silva et al., 2011).

Dentre as amostras que desenvolveram a deterioração *blown pack*, apenas das amostras 2 e 5 não foi possível o isolamento e a consequente identificação

bioquímica de clostrídios sulfito redutores, embora tenha tido uma alta contagem presuntiva nessas amostras com 72 horas de incubação das placas. Isso deve-se pelo fato de que as colônias características foram isoladas seguindo o protocolo da APHA 33.72:2015, somente das placas com até 200 colônias características incubadas por 24 horas; e como essas amostras apresentaram contagens de  $0 \log_{10}$  UFC/g em todos os dias analisados nas primeiras 24 horas de incubação das placas, não foi possível o isolamento; com exceção para o dia 21, que embora tenha tido contagem em todas as amostras, nenhuma colônia característica foi isolada em todo o estudo.

Alternativamente ao protocolo, testamos o isolamento de colônias características em 48 e 72 horas de incubação das placas, porém sem sucesso, visto que não houve a multiplicação de colônias características quando estriadas no ágar TSC para purificação. Assim, a identificação bioquímica de clostrídios sulfito redutores foi confirmada em 77,8% das amostras de carne bovina embalada a vácuo com deterioração *blown pack*. Hernández-Macedo et al. (2012) identificam *Clostridium spp.* em 10 das 15 amostras (66%) analisadas com a deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo originada do Brasil. Em um estudo conduzido por Mang et al. (2021), onde foram analisadas 60 amostras de carne bovina embaladas a vácuo no varejo, 32 (53%) foram identificadas como positivas para a ocorrência de *Clostridium spp.* De acordo com Bonke et al. (2016), a presença de clostrídios psicrotolerantes e psicrófilos utilizando diferentes tipos de PCR foi constatada em 33 das 96 amostras (34,4%) de carne bovina da Alemanha, Irlanda, EUA, Argentina, Austrália e Nova Zelândia. Broda et al. (1997) determinou a prevalência de clostrídios psicrófilos antes e depois da estocagem em temperatura inadequada de armazenamento (15 °C) e refrigeração (- 1,5 °C). No total, apenas 3 amostras (6,7%) foram positivas para a presença desses microrganismos antes da estocagem. Após o armazenamento a 15 °C durante 8 semanas, clostrídios psicrófilos foram encontrados em 51,1% das amostras, todas apresentando a deterioração *blown pack*.

Portanto, os resultados de nossa pesquisa demonstram que esses microrganismos estão envolvidos no surgimento da deterioração *blown pack*. Porém, testes complementares para avaliação da capacidade dos isolados obtidos em produzirem gás e outros compostos envolvidos na deterioração *blown pack* ainda são necessários. Além disso, outros grupos de microrganismos são capazes de se

multiplicar a 15 °C e causar este tipo de deterioração, como bactérias da Família Enterobacteriaceae e as bactérias lácticas (Broda et al., 1997; Brightwell et al., 2007; Pennacchia et al., 2011). O potencial de alguns microrganismos em causar a deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo armazenada em temperatura refrigerada (4 °C) e temperatura inadequada de armazenamento (15 °C) foi avaliado. *Hafnia alvei* e *Lactobacillus pentosus* foram capazes de provocar a deterioração *blown pack* (Chaves et al., 2012).

Apesar do recente interesse, ainda há dados limitados sobre a prevalência e os fatores-chave que influenciam na incidência dos clostrídios associada a deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo. A má recuperação de clostrídios psicrotróficos, psicrotolerantes e psicrófilos associados a deterioração *blown pack* foi relatada anteriormente, demonstrando dificuldades com o isolamento convencional desses microrganismos (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989; Broda et al., 1996). A diversidade desses clostrídios associados com a deterioração *blown pack* impede a identificação através de um único método ou técnica de recuperação e conseqüentemente outras técnicas complementares seletivas devem ser usadas para que a recuperação abrangente seja garantida (Broda et al., 1998).

Várias limitações podem ser atribuídas aos métodos convencionais para identificação dos isolados de *Clostridium spp.* associados a deterioração *blown pack*. O longo tempo de incubação e os procedimentos adotados para o cultivo celular (temperatura, meios de cultura, tempo e geração de anaerobiose) exigem um conhecimento prévio das espécies potencialmente presentes e podem não permitir a recuperação de todas as espécies de *Clostridium spp.*, particularmente daquelas com potencial de deterioração (Húngaro et al., 2016). Atualmente, tem sido bastante utilizado técnicas moleculares para identificação de espécies de *Clostridium spp.* envolvidos na deterioração *blown pack*.

Boerema et al. (2003) demonstram que as maiores incidências de clostrídios psicrotróficos foram detectados usando métodos moleculares, sugerindo que a detecção molecular de fragmentos específicos do gene 16S rRNA é o método mais sensível. No entanto, deve-se ter cuidado na interpretação desses dados, uma vez que esses métodos apenas detectam a presença de DNA alvo na amostra, não sendo possível confirmar se os microrganismos estão viáveis. Um resultado positivo da PCR na ausência de células viáveis tem pouco ou nenhum significado em relação a possível ocorrência da deterioração *blown pack*, visto que as células não viáveis

ou os fragmentos de DNA não podem proliferar e deteriorar a carne embalada a vácuo. Por isso, é essencial a detecção e confirmação da presença de clostrídios viáveis na carne embalada a vácuo com a deterioração *blown pack* para um melhor entendimento e solução deste problema.

Portanto, melhorias nos métodos de detecção, isolamento e identificação molecular dessas bactérias são necessárias para realizar estudos de rastreamento da origem e distribuição desses microrganismos desde a fazenda até o momento do processamento dos produtos, visando melhorar a compreensão quanto ao potencial dessas bactérias em causar este tipo de deterioração em carne bovina. O *16S rRNA Gene Sequencing* tem sido amplamente utilizado para a identificação de espécies de *Clostridium spp.* em casos da deterioração *blown pack* (Boerema et al., 2003; Byrne et al., 2009; Hernández-Macedo et al., 2012; Silva et al., 2011; Brightwell et al., 2018). Além disso, o uso da metagenômica associada a metabolômica pode constituir uma estratégia interessante para entender o papel desses microrganismos, as interações destes com a microbiota da carne e seus impactos na ocorrência da deterioração *blown pack*.

A temperatura de armazenamento é o fator mais importante na prevenção e no ato de retardar a deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo. Manter baixas temperaturas é especialmente importante quando há a presença de microrganismos deteriorantes psicrótrófos. Portanto, o controle da temperatura em que a carne embalada a vácuo é armazenada pode limitar a multiplicação de bactérias, prolongar a vida útil do produto e retardar o início da deterioração *blown pack*. A composição da microbiota competitiva, o vácuo aplicado dentro das embalagens e a aplicação de tratamentos utilizados para descontaminação da carne são outros fatores que podem afetar o surgimento da deterioração *blown pack*. Além disso, a carga microbiana inicial (número de esporos/células vegetativas) interfere no tempo de início em que a esta deterioração ocorre (Húngaro et al., 2016).

Algumas outras estratégias podem ser adotadas para prevenir e minimizar a ocorrência da deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo. Os cuidados com a criação e limpeza dos animais são essenciais para diminuir a contaminação do gado, uma vez que as partículas do solo e as fezes dos próprios animais são os principais focos de contaminação. A limpeza das instalações e equipamentos, os cuidados com a higiene dos manipuladores de alimentos também são técnicas recomendadas para reduzir a contaminação da carne.

#### 5.4. Identificação molecular de *Clostridium spp.*

A identificação de *Clostridium spp.* do Grupo I (*Clostridium cluster I*) pelo método da PCR foi realizada com o objetivo de identificar o gênero dos 213 isolados confirmados como clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* nos testes bioquímicos, avaliando a confiabilidade da metodologia utilizada no estudo e a possível relação desses microrganismos com a deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo. Os primers utilizados são capazes de identificar espécies como *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium tertium* e *Clostridium tetanomorphum* (Song et al., 2004; Le Bourhis et al., 2005).

Foi realizada a identificação molecular do Grupo I de *Clostridium* de 193 isolados (90,6%), devido a etapa de purificação, visto que alguns não foram recuperados. Destes, 158 (81,9%) foram identificados molecularmente como *Clostridium spp.* do grupo I (*Clostridium cluster I*) (Figuras 6 e 7).

Detalhadamente, 142 (91%) dos 156 isolados confirmados bioquimicamente como *C. perfringens* foram confirmados como *Clostridium spp.* do grupo I. Enquanto 158 (81,9%) dos 193 isolados confirmados bioquimicamente como *Clostridium* sulfito redutor foram confirmados como *Clostridium spp.* do grupo I

Alguns isolados (n = 45 e 18) classificados bioquimicamente como clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*, respectivamente, não foram confirmados como *Clostridium spp.* do grupo I pela técnica de PCR. Esse resultado pode estar relacionado a especificidade do ágar TSC em relação ao isolamento de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*, além da capacidade de outros microrganismos reduzirem o sulfito, resultando no desenvolvimento de colônias similares.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Através dos resultados obtidos, podemos concluir que as amostras de carne bovina embalada a vácuo analisadas tem significativa presença de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*.
- ✓ Carne bovina embalada a vácuo armazenada em temperatura de refrigeração (4 °C) controla a multiplicação exacerbada de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* quando comparado com carne bovina embalada a vácuo armazenada em temperatura inadequada de armazenamento (15 °C) durante 28 dias de estocagem.
- ✓ A carne bovina embalada a vácuo, quando armazenada em temperatura inadequada de armazenamento (15 °C) a partir de 7 dias pode apresentar o surgimento da deterioração *blown pack*.
- ✓ Testes complementares são necessários para identificação adequada das espécies de *Clostridium spp.* do grupo I. Além disso, a avaliação do potencial deteriorante dos isolados obtidos e a determinação do potencial patogênico dos isolados confirmados como *Clostridium perfringens* são etapas relevantes para melhor caracterização e compreensão dos fatores relacionados a deterioração *blown pack* em carne bovina embalada a vácuo e riscos associados ao consumo de carnes contaminadas por esse grupo de microrganismos.

## REFERÊNCIAS

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne). **BEEF REPORT (Perfil da Pecuária no Brasil 2020)**.

ADAM, K. H.; FLINT, S. H.; BRIGHTWELL, G. **Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: Sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison**. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1539–1544. (2010). doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02320.x.

AKKERMAN, R.; FARAHANI, P.; GRUNOW, M. **Quality, safety and sustainability in food distribution: a review of quantitative operations management approaches and challenges**. *OR Spectrum* 32, 863–904. (2010). doi: 10.1007/s00291-010-0223-2.

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P.E. **What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?** *International Journal of Food Microbiology*, 28, 145-155. (1995). doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00053-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00053-4).

ANGELOTTI, R.; HALL, H. E.; FOTER, M. J.; LEWIS, K. H. **Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods**. *Applied microbiology*, 10(3), 193–199. (1962). doi: <https://doi.org/10.1128/am.10.3.193-199.1962>.

AUNG, M. M.; CHANG, Y. S. **Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives**. *Food Control*, Volume 39, Pages 172-184, ISSN 0956-7135. (2014). doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.007>.

BAŞKAYA, R.; KARACA, T., SEVİNÇ, İ.; ÇAKMAK, Ö.; YILDIZ, A.; YÖRÜK, M. **İstanbul'da Satışa Sunulan Hazır Kıymaların Histolojik, Mikrobiyolojik ve Serolojik Kalitesi**. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 41-46. (2004).

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*. Volume 34, Issue 4, (2001), Pages 271-275, ISSN 0963-9969. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00144-7.

BENNETT, S. D., WALSH, K. A.; GOULD, L. H. **Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*--United States, 1998-2008**. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(3), 425–433. (2013). doi: <https://doi.org/10.1093/cid/cit244>.

BLAGOJEVIC, B.; ANTIC, D. **Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses**. *Food Control*, 36, 174-182. (2014). doi: 10.1016/j.foodcont.2013.08.018.

BÖCKER, A. **Consumer response to a food safety incident: exploring the role of supplier differentiation in an experimental study.** *European Review of Agricultural Economics*. Volume 29, Issue 1, Pages 29–50. (2002). doi: <https://doi.org/10.1093/erae/29.1.29>

BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; BELL, R. G. **Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures.** *Letters in applied microbiology*, 36(6), 406–411. (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01332.x>

BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; BELL, R. G. **PCR detection of psychrotolerant clostridia associated with deep tissue spoilage of vacuum-packed chilled meats.** *Letters in applied microbiology*, 35(5), 446–450. (2002). <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01205.x>

BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; PENNEY, N.; BRIGHTWELL, G. **Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of "blown pack" spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef.** *Journal of food protection*, 70(6), 1434–1439. (2007). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.6.1434>.

BOLTON, D. J.; CARROLL, J.; WALSH, D. **A four-year survey of blown pack spoilage *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* on beef primal cuts.** *Letters in applied microbiology*, 61(2), 153–157. (2015). doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12431>.

BONKE, R.; DREES, N.; GAREIS, M. **Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods.** *FEMS microbiology letters*, 363(1), fnv218. (2016). doi: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv218>.

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1950-1969/D30691.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D30691.htm). Acesso em: 10 de junho de 2022.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2017/Decreto/D9013.htm#art541](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2017/Decreto/D9013.htm#art541). Acesso em: 10 de junho de 2022.

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*, Volume 119, Issue 3, Pages 334–339. (2007). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.024>.

BRIGHTWELL, G.; HORVÁTH, K. M. **Molecular discrimination of New Zealand sourced meat spoilage associated psychrotolerant Clostridium species by ARDRA and its comparison with 16s RNA gene sequencing.** Meat science, 138, 23–27. (2018). doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.12.007>.

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 casings.** International Journal of Food Microbiology, Volume 29, Pages 335- 352. (1996). doi: [10.1016/0168-1605\(95\)00070-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00070-4).

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. Volume 39, Pages 69–78. (1998). doi: [10.1016/s0168-1605\(97\)00120-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00120-7).

BRODA, D. M.; DELACY, K. M.; COOK, R. L.; BELL, R. G. **Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures, New Zealand.** Journal of Agricultural Research. 40:1, 93-98. (1997). doi: [10.1080/00288233.1997.9513236](https://doi.org/10.1080/00288233.1997.9513236)

BRODA, D. M.; LAWSON, P. A.; BELL, R. G.; MUSGRAVE, D. R. **Clostridium frigidicarnis sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats.** International journal of systematic bacteriology, 49 Pt 4, 1539–1550. (1999). doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1539>

BRODA, D. M.; MUSGRAVE, D. R.; BELL, R. G. **Molecular differentiation of clostridia associated with "blown pack" spoilage of vacuum-packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis.** International journal of food microbiology, 84(1), 71–77. (2003). doi: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00396-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00396-3)

BRODA, D. M.; MUSGRAVE, D. R.; BELL, R. G. **Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotropic clostridia associated with blown pack' spoilage of vacuum-packed meats.** Journal of applied microbiology, 88(1), 107–116. (2000). doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00925.x>

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, 50 Pt 1, 107–118. (2000). doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-107>

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, 45(3), 336–341. (2007). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02196.x>

BYRNE, B.; MONAGHAN, A.M.; LYNG, J.G.; SHERIDAN, J.J.; BOLTON, D.J. **A case of "blown pack" meat linked to Clostridium estertheticum in Ireland.**

Journal of Food Safety 29, 629-635. (2009). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00182>.

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P.E. **Clostridium perfringens and foodborne infections**. International Journal of Food Microbiology, 74(3), 195-202. (2002). doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00680-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00680-8)

CARANOVA, A.R.P. **Implementação de um sistema de segurança alimentar num trabalho baseado na metodologia HACCP**. Dissertação Mestrado – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. (2008).

CAVILL, L.; RENTERIA-MONTEERRUBIO, A. L.; HELPS, C. R.; CORRY, J. E. **Detection of cold-tolerant clostridia other than Clostridium estertheticum in raw vacuum-packed chill-stored meat**. Food microbiology, 28(5), 957–963. (2011). doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.003>

CHAE, H. S.; KIM, Y. H.; KIM, J. Y.; KIM, J. H.; KIM, G. H; CHOI, T. S.; SHIN B. W.; LEE, D. J.; LEE, J. H. **Isolation and characterization of Clostridium perfringens on bovine and porcine carcass**. Korean J. Vet. Serv. 29: 97–102. (2006).

CHAVES, R. D.; SILVA, A. R.; SANT´ANA, A. S.; CAMPANA, F. B.; MASSAGUER, P. R. **Gas-producing and spoilage potencial of lactic acid bacteria isolated from chilled vacuum-packaged beef**. International Journal of Food Science and Technology. (2012). doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03030.x>.

CHEN, C.; ZHANG, J.; DELAURENTIS, T. **Quality control in food supply chain management: An analytical model and case study of the adulterated milk incident in China**. International Journal of Production Economics. Volume 152, Pages 188-199, ISSN 0925-5273, (2014). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2013.12.016>.

CHON, J. W.; PARK, J. S.; HYEON, J. Y.; PARK, C.; SONG, K. Y.; HONG, K. W.; HWANG, I. G.; KWAK, H. S.; SEO, K. H. **Development of real-time PCR for the detection of Clostridium perfringens in meats and vegetables**. Journal of microbiology and biotechnology, 22(4), 530–534. (2012). doi: <https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07064>.

CHUKWU, E. E.; NWAOKORIE, F. O.; COKER, A. O.; AVILA-CAMPOS, M. J.; SOLIS, R. L.; LLANCO, L. A.; OGUNSOLA, F. T. **Detection of toxigenic Clostridium perfringens and Clostridium botulinum from food sold in Lagos, Nigeria**. Anaerobe, 42, 176–181. (2016). doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.009>

CLEMENS, R. M.; ADAM, K. H.; BRIGHTWELL, G. **Contamination levels of Clostridium estertheticum spores that result in gaseous spoilage of vacuum-packaged chilled beef and lamb meat**. Letters in applied microbiology, 50(6), 591–596. (2010). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02838.x>.

COLLINS, M. D.; RODRIGUES, U. M.; DAINTY, R. H.; EDWARDS, R. A.; ROBERTS, T. A. **Taxonomic studies on a psychrophilic Clostridium from**

**vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov.** FEMS microbiology letters, 75(2-3), 235–240. (1992). doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90410-p](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90410-p)

CORTINAS, T. I.; MICALIZZI, B.; DE GUZMAN, A. M. **Influence of culture conditions on growth and protective antigenicity of *Clostridium chauvoei*.** The Journal of applied bacteriology, 77(4), 382–387. (1994). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03438.x>.

COŞANSU, S.; ERSÖZ, Ş.Ş. **Incidence and contamination level of *Clostridium perfringens* in meat and meat products sold in Sakarya province of Turkey.** Food and Health, 7(3), 172-178. (2021). doi: <https://doi.org/10.3153/FH21018>

CRANDALL, A. D; MONTVILLE, T. J. **Inhibition of *Clostridium botulinum* growth and toxigenesis in a model gravy system by coinoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria.** J. Food Prot. 56, 485-488. (1993).

DAINTY, R.H.; EDWARDS, R.A.; HIBBARB, C.M. **Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp.** J Sci Food Agric, 49 (4):.473- 486. (1989). doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490410>

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. **The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes.** Society for Applied Bacteriology symposium series, 21, 103S–14S. (1992). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb03630.x>

DALTON, C. B.; GREGORY, J.; KIRK, M. D.; STAFFORD, R. J.; GIVNEY, R.; KRAA, E.; GOULD, D. **Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000.** Communicable diseases intelligence quarterly report, 28(2), 211–224. (2004).

DE JONG, A. E.; EIJHUSEN, G. P.; BROUWER-POST, E. J.; GRAND, M.; JOHANSSON, T.; KÄRKKÄINEN, T.; MARUGG, J.; IN'T VELD, P. H.; WARMERDAM, F. H.; WÖRNER, G.; ZICAVO, A.; ROMBOUTS, F. M.; BEUMER, R. R. **Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods.** Journal of microbiological methods, 54(3), 359–366. (2003). doi: [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00069-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00069-1).

DOULGERAKI, A. I.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F.; NYCHAS, G. J. **Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions.** International journal of food microbiology, 157(2), 130–141. (2012). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>

DURACOVA, M.; KLIMENTOVA, J.; FUCIKOVA, A. M.; ZIDKPVA, L.; SHESHKO, V.; REHULKOVA, H.; DRESLER, J.; KROCOVA, Z. **Targeted Mass Spectrometry Analysis of *Clostridium perfringens* Toxins.** Toxins, 11(3), 177. (2019). doi: <https://doi.org/10.3390/toxins11030177>

DURAN, A.; KAHVE, H. I. **The effect of chitosan coating and vacuum packaging on the microbiological and chemical properties of beef.** Meat science, 162, 107961. (2020). doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107961>

EFSA-ECDC (European Food Safety Authority-European Centre for Disease Prevention and Control). **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and food-borne outbreaks in 2014.**

EFSA Journal, 13(4329), 191. (2015). doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329>  
EMPRAPA. **Nota técnica – Segurança do Alimento Carne.** Campo Grande. (2017). Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/SegurancaAlimentoCarne.pdf/71de9327-7649-a22d-15ad-ffe18c8772fd>. Acesso em: 10 de junho de 2022.

ERCOLINI, D.; FERROCINO, I.; NASI, A.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; LASTORIA, A.; LAGHI, L.; MAURIELLO, G.; GUERZONI, M. E.; VILLANI, F. **Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions.** Applied and environmental microbiology, 77(20), 7372–7381. (2011). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.05521-11>

FELÍCIO, P. E. **QUALIDADE DA CARNE BOVINA: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E ORGANOLÉPTICAS.** In: XXXVI Reunião Anual da SBZ, Porto Alegre. Anais. Rio Grande do Sul: Sociedade Brasileira de Zootecnia (no prelo). (1999).

FELIPE L.M.; **Associação De Bactérias Da Família Enterobacteriaceae e Clostridium estertheticum com a Deterioração “Blown Pack” em Cortes Carneos Embalados a Vácuo.** Brasil, 181p. (PhD Dissertation. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP- Jaboticabal). (2008).

FILHO, A. L; **Produção de carne bovina no Brasil: qualidade, quantidade ou ambas?** II SIMBOI – Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, Brasília-DF. (2006).

FISCHER, M.; ZHU, S.; DE REE, E. **Culture media for the detection and enumeration of clostridia in food.** In: Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology, J.E.L Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird (Eds.), Royal Society of Chemistry Publishing, p. 66-89. (2012). doi: <https://doi.org/10.1039/9781847551450-00066>.

FURLANETTO et al. **Avaliação da vida de prateleira e da qualidade de amostras de carne bovina resfriada embaladas à vácuo no período de 120 dias.** (2020). doi: 10.34117/bjdv6n7-840.

GARCÍA, S.; VIDAL, J.E.; HEREDIA, N.; JUNEJA, V.K. **Clostridium perfringens.** In: Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers, Michael P. Doyle, Francisco Diez-Gonzalez, Colin Hill (Editors), 5th Edition. ASM Books, pp. 513- 540. (2019). doi: <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch19>.

GHONEIM, N. H.; HAMZA, D. A. **Epidemiological studies on Clostridium perfringens food poisoning in retail foods.** Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 36(3), 1025–1032. (2017). doi: <https://doi.org/10.20506/rst.36.3.2734>.

GKIOURTZIDIS, K.; FREY, J.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; ILIADIS, N.; SARRIS, K. **PCR detection and prevalence of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta$ 2-,  $\epsilon$ -,  $\iota$ - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery.** *Veterinary Microbiology*, Volume 82, Issue 1. Pages 39-43, ISSN 0378-1135. (2001). doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00327-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00327-3).

GORMLEY, F. J.; LITTLE, C. L.; RAWAL, N.; GILLESPIE, I. A.; LEBAIGUE, S.; ADAK, G. K. **A 17-year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992-2008).** *Epidemiology and Infection*, 139(5), 688–699. (2011). doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268810001858>

GOSSNER, C. M.; SCHLUNDT, J.; BEM-EMBAREK, P.; HIRD, S.; LO-FO-WONG, D.; BELTRAN, J. J.; TEOH, K. N.; TRITSCHER, A. **The melamine incident: implications for international food and feed safety.** *Environmental Health Perspectives*, 117(12), 1803–1808. (2009). doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.0900949>

GRASS, J. E.; GOULD, L. H.; MAHON, B. E. **Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010.** *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2), 131–136. (2013). doi: <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1316>

GURAN, H. S.; VURAL, A.; ERKAN, M. E. **The prevalence and molecular typing of *Clostridium perfringens* in ground beef and sheep meats.** *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 9(2), 121-128. (2014). doi: <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0866-z>.

HASSANI, S.; PAKBIN, B.; BRUCK, W. M.; MAHMOUDI, R.; MOUSAVI, S. **Prevalence, Antibiotic Resistance, Toxin-Typing and Genotyping of *Clostridium perfringens* in Raw Beef Meats Obtained from Qazvin City, Iran.** *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(3), 340. (2022). doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030340>.

HEDRICK, H.B.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A. **Principles of meat science.** Dubuque: Kendall/Hunt Publishing Company. (1993).

HELPS, C.R.; HARBOUR, D.A.; CORRY, J. E. L. **PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef.** *International Journal of Food Microbiology*, Volume 52, Pages 57–65. (1999). doi: [10.1016/S0168-1605\(99\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00116-6).

HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L.; BARANCELLI, G. V.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. **Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: a review.** *Brazilian Journal of Microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 42(1), 1–11. (2011). doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100001>

HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; TSAI, S. M.; DA CRUZ, S. H.; SARANTOPOULOS, C. I.; PADULA, M.; DIAS, C. T. **Gases and volatile compounds associated with micro-organisms in blown pack spoilage**

**of Brazilian vacuum-packed beef.** Letters in applied microbiology, 55(6), 467–475. (2012). doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12004>.

HÚNGARO, H. M.; CATURLA, M. Y. R.; HORITA, C. N.; FURTADO, M. M.; SANT'ANA, A. S. **Blown pack spoilage in vacuum-packaged meat: A review on clostridia as causative agents, sources, detection methods, contributing factors and mitigation strategies,** Trends in Food Science & Technology, Volume 52, Pages 123-138, ISSN 0924-2244. (2016). doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.010>.

HUNTER, S. E.; BROWN, J. E.; OYSTON, P. C.; SAKURAI, J.; TITBALL, R. W. **Molecular genetic analysis of beta-toxin of Clostridium perfringens reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of Staphylococcus aureus.** Infection and immunity, 61(9), 3958–3965. (1993). doi: <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3958-3965.1993>.

JANG, Y. S.; KIM, D. H.; BAE, D.; KIM, S. H.; Kim, H.; MOON, J. S.; SONG, K. Y.; CHON, J. W.; SEO, K. H. **Prevalence, toxin-typing, and antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens from retail meats in Seoul, Korea.** Anaerobe, 64, 102235. (2020). doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102235>

JEONG, D.; KIM, D. H.; KANG, I. B.; CHON, J. W.; KIM, H.; OM, A. S.; LEE, J. Y.; MOON, J. S.; OH, D. H.; SEO, K. H. **Prevalence and toxin type of Clostridium perfringens in beef from four different types of meat markets in Seoul, Korea.** Food science and biotechnology, 26(2), 545–548. (2017). doi: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0075-5>

JEREMIAH, L. E. **Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution.** Food Research International (Ottawa, Ont.). (2001). 34(9):749-772. doi: 10.1016/s0963-9969(01)00096-5.

JIANG, H.; QIN, Y. M.; YANG, X. T.; LI, Q. L.; SHEN, Q. C.; DING, J. B.; WEI, R. Y.; ZHANG, J. D.; SUN, J. L.; SUN, M. J.; FAN, X. Z. **Bacteriological and molecular typing of Clostridium perfringens strains isolated in retail beef in Beijing, China.** The Journal of veterinary medical science, 83(10), 1593–1596. (2021). doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0129>.

JIANG, Y.; MA, Y.; LIU, Q.; LI, T.; LI, Y.; GUO, K.; ZHANG, Y. **Tracing Clostridium perfringens strains from beef processing of slaughter house by pulsed-field gel electrophoresis, and the distribution and toxinotype of isolates in Shaanxi province, China.** Food microbiology, 101, 103887. (2022). doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103887>

JONES, R. J.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. R. **Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage.** Food Microbiology, Volume 26, Issue 8, Pages 876– 881, (2009). doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.06.003>

JUNEJA, V. K.; BAKER, D. A.; THIPPAREDDI, H.; SNYDER JR, O. P.; MOHR, T. B. **Growth potential of *Clostridium perfringens* from spores in acidified beef, pork, and poultry products during chilling.** Journal of food protection, 76(1), 65–71. (2013). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-289>

JUNEJA, V. K.; MARMER, B. S.; MILLER, A. J. **Growth and Sporulation Potential of *Clostridium perfringens* in Aerobic and Vacuum-Packaged Cooked Beef.** Journal of food protection, 57(5), 393–398. (1994). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.5.393>.

JUNEJA, V. K.; MARMER, B. S.; PHILLIPS, J. G.; PALUMNO, S. A. **Interactive Effects of Temperature, Initial pH, Sodium Chloride, and Sodium Pyrophosphate on the Growth Kinetics of *Clostridium perfringens* †.** Journal of food protection, 59(9), 963–968. (1996). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.9.963>.

JUNEJA, V. K.; NOVAK, J. S.; LABBE, R. J. ***Clostridium perfringens*. In: Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions.** V.K. Juneja, J.N. Sofos (Eds.), ASM Press, Washington DC, USA. p. 53-70. (2010). doi: <https://doi.org/10.1128/9781555815936.ch4>

JUNEJA, V. K.; THIPPAREDDI, H.; FRIEDMAN, M. **Control of *Clostridium perfringens* in cooked ground beef by carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, or oregano oil during chilling.** Journal of food protection, 69(7), 1546–1551. (2006). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.7.1546>

KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; FIELD, R. A. **Characteristics of Psychrotrophic *Clostridium laramie* Causing Spoilage of Vacuum-packaged Refrigerated Fresh and Roasted Beef.** Journal of food protection, 56(1), 13–17. (1993). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.1.13>

KALCHAYANAND, N.; RAY, B.; FIELD, R. A.; JOHNSO, M. C. **Spoilage of Vacuum-Packaged Refrigerated Beef by *Clostridium*.** Journal of food protection, 52(6), 424–426. (1989). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.6.424>.

KAMBER, U.; GOKCE, H. I.; ELMALI, M. ***Clostridium perfringens* and its toxins in minced meat from Kars, Turkey.** Food Additives and Contaminants, 24(7), 673–678. (2007). doi: <https://doi.org/10.1080/02652030601186129>.

KHAN, M. A.; BAHADAR, S.; ULLAH, N.; ULLAH, S.; SHAKEEB, U.; KHAN, Z.; KHAN, I. U.; KALHORO, N. U.; SHAH, M. B.; MALIK, M. I. U. **Distribution and antimicrobial resistance patterns of Clostridium Perfringens isolated from vaccinated and unvaccinated goats**. Small Ruminant Research, Volume 173, (2019), Pages 70-73, ISSN 0921-4488. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.02.011>.

KOMATSU, H.; INUI, A.; SOGO, T.; FUJISAWA, T. **Nihon rinsho**. Japanese journal of clinical medicine, 70(8), 1357–1361. (2012).

KOUASSI, K. A.; DADIE, A. T.; N'GUESSAN, K. F.; DJE, K. M.; LOUKOU, Y. G. **Clostridium perfringens and Clostridium difficile in cooked beef sold in Côte d'Ivoire and their antimicrobial susceptibility**. Anaerobe, 28, 90–94. (2014). doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.012>

LAWSON, P.; DAINY, R. H.; KRISTIANSEN, N.; BERG, J.; COLLINS, M. D. **Characterization of a psychrotrophic Clostridium causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of Clostridium algidicarnis sp. nov.** Letters in applied microbiology, 19(3), 153–157. (1994). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00930.x>.

LE BOURHIS, A. G.; SAUNIER, K.; DORÉ, J.; CARLIER, J. P.; CHAMBA, J. F.; POPOFF, M. R.; THOLOZAN, J. L. **Development and validation of PCR primers to assess the diversity of Clostridium spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis**. Applied and environmental microbiology, 71(1), 29–38. (2005). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.29-38.2005>.

LINDSTRÖM, M.; KIVINIEMI, K.; KORKEALA, H. **Hazard and control of group II (non-proteolytic) Clostridium botulinum in modern food processing**. International journal of food microbiology, 108(1), 92–104. (2006). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.003>.

**List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)** - <https://www.bacterio.net/>. Acesso em: 15 de junho de 2002.

MAIKANOV, B.; MUSTAFINA, R.; AUTELEYEVA, L.; WISNIEWSKI, J.; ANUSZ, K.; GRENDA, T.; KWIA TEK, K.; GOLDSZTEJN, M.; GRABCZAK, M. **Clostridium botulinum and Clostridium perfringens Occurrence in Kazakh Honey Samples**. Toxins, 11(8), 472. (2019). doi: <https://doi.org/10.3390/toxins11080472>.

MANG, S.; SCHWAIGER, K.; LINDNER, R.; GAREIS, M.; DORN-IN, S. **High incidence of cold-tolerant Clostridium frigoriphilum and C. algidicarnis in vacuum-packed beef on retail sale in Germany**. International journal of food microbiology, 340, 109053. (2021). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109053>.

MARUCHECK, A. S.; GREIS, N. P.; MENA, C.; CAI, L. **Product safety and security in the global supply chain: Issues, challenges and research opportunities.** *Journal of Operations Management*, 29, 707-720. (2011).

MCLANE, B.A.; ROBERTSON, S.L.; LI, J. (2012). **Clostridium perfringens.** In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, M.P. Doyle, R.L. Buchanan (Eds.), American Society for Microbiology Press, p.465-489. (2012). doi: <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch18>

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M. TAUXE, R. V. **Food-related illness and death in the United States.** *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607–625. (1999). doi: <https://doi.org/10.3201/eid0505.990502>.

MELO, A. F.; MOREIRA, J. M.; ATAÍDES, D. S.; GUIMARÃES, R. A. M.; LOIOLA, J. L.; OLIVEIRA, R. Q. **Fatores que influenciam na qualidade da carne bovina: Revisão.** v. 10 No. 10 p. 721-794, (2016).

MESQUITA, M. O. **Procedimento para avaliação da qualidade da carne bovina in natura na recepção em serviços de alimentação.** 295 f. Tese de doutorado do programa de pós-graduação em ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFMS – RS). (2014).

MIKI, Y.; MIYAMOYO, K.; KANEKO-HIRANO, I.; FUJIUCHI, K.; AKIMOTO, S. **Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying Clostridium perfringens isolates from retail meat products in Japan.** *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5366–5372. (2008). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00783-08>.

MOSCHONAS, G.; BOLTON, D. J. **Characterization of a potentially novel 'blown pack' spoilage bacterium isolated from bovine hide.** *Journal of applied microbiology*, 114(3), 771–777. (2013). doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12077>.

MOSCHONAS, G.; BOLTON, D. J.; MCDOWELL, D. A.; SHERIDAN, J. J. **Diversity of culturable psychrophilic and psychrotrophic anaerobic bacteria isolated from beef abattoirs and their environments.** *Applied and environmental microbiology*, 77(13), 4280–4284. (2011). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01778-10>.

MOSCHONAS, G.; BOLTON, D. J.; SHERIDAN, J. J.; MCDOWELL, D. A. **Isolation and sources of 'blown pack' spoilage clostridia in beef abattoirs.** *Journal of applied microbiology*, 107(2), 616–624. (2009). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x>.

NAVARRO, M. A.; MCCLANE, B. A.; UZAL, F. A. **Mechanisms of Action and Cell Death Associated with Clostridium Perfringens Toxins.** *Toxins*. (2018). 10:212. doi: 10.3390/toxins10050212.

NEOPROSPECTA. **CARNE EMBALADA A VÁCUO: CONSERVAÇÃO, DETERIORAÇÃO E MICRORGANISMOS CONTAMINANTES.** 2019. DISPONÍVEL EM: [HTTPS://BLOG.NEOPROSPECTA.COM/CARNE-](https://blog.neoprospecta.com/carne-)

EMBALADA-VACUO-CONSERVACAO-DETERIORACAO  
MICROORGANISMOS-CONTAMINANTES/. ACESSO EM: 20 DE MAIO DE  
2022.

NEOPROSPECTA. **CLOSTRIDIUM, CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS E  
“BLOWN PACK”**. 2020. DISPONÍVEL EM:  
HTTPS://BLOG.NEOPROSPECTA.COM/CLOSTRIDIUM-CONTAMINACAO-  
ALIMENTOS-BLOWN-PACK/. ACESSO EM: 20 DE MAIO DE 2022.

NOVAK, J. S.; YUAN, J. T. **Viability of Clostridium perfringens, Escherichia coli,  
and Listeria monocytogenes surviving mild heat or aqueous ozone treatment  
on beef followed by heat, alkali, or salt stress**. Journal of food protection, 66(3),  
382–389. (2003). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.3.382>.

NYCHAS, G. J.; SKANDAMIS, P. N.; TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K. P. **Meat  
spoilage during distribution**. Meat science, 78(1-2), 77–89. (2008). doi:  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>.

OBARA, T. R. A.; JORGE, P. S.; MENDONÇA, C. C. T. **Benefícios do uso da  
embalagem a vácuo em carnes e produtos cárneos (revisão)**. (2011).

PALEVICH, N.; PALEVICH, F. P.; MACLEAN, P. H.; ALTERMANN, E.; GARDNER,  
A.; BURGESS, S.; MILLS, J.; BRIGHTWELL, G. **Comparative genomics of  
Clostridium species associated with vacuum-packed meat spoilage**. Food  
microbiology, 95, 103687. (2021). doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103687>.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F. **Spoilage-related microbiota  
associated with chilled beef stored in air or vacuum pack**. Food  
microbiology, 28(1), 84–93. (2011). doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.010>.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. **Clostridium perfringens: toxinotype and  
genotype**. Trends in microbiology, 7(3), 104–110. (1999). doi:  
[https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(98\)01430-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(98)01430-9).

PREVOST, S.; CAYOL, J. L.; ZUBER, F. **Characterization of clostridial species  
and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbio-  
al quality and safety**. Food Control. 222–227(1):222–227. (2013). doi:  
[10.1016/j.foodcont.2012.11.030](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.030).

PICHNER, R. A.; ZIEGLER, E.; ECKARDT, S.; KABISH, J.; HECHELMANN, H.;  
GAREIS, M. **Detection of microorganisms in refrigerated blown pack spoilage**.  
Fleischwirtschaft -Frankfurt- 92(9):117-124. (2012).

POTY, I. O.; PALMA, J. M.; LOBATO, F. C. F.; MOTA, A. L. A. A. **Clostridium  
perfringens research on vacuum packed beef commercialized on Distrito  
Federal and in the surrounding**. Volume 39, Issue 1, 165-174. (2018). doi:  
[10.5433/1679-0367.2018v39n1p69](https://doi.org/10.5433/1679-0367.2018v39n1p69).

PULLMAN, M.; Wu, Z. **Food Supply Chain Management: Economic, Social and Environmental Perspectives** (1st ed.). Routledge. (2011). doi: <https://doi.org/10.4324/9780203806043>.

RAUECKER, U. N.; DEL'ACQUA, T. V.; MESQUITA, A. Q.; NUNES, I. A; MESQUITA, A. J. **Detecção de Clostridium estertheticum e Clostridium gasigenes incriminados na deterioração de carnes bovinas refrigeradas embaladas a vácuo através da técnica de PCR**. III Congresso De Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG-CONPEEX, Goiânia- GO. Anais eletrônicos do III Seminário de Pós-Graduação da UFG [CD-ROM]. (2006).

REID, R.; FANNING, S.; WHYTE, P.; KERRY, J.; BOLTON, D. **Comparison of hot versus cold boning of beef carcasses on bacterial growth and the risk of blown pack spoilage**. Meat science, 125, 46–52. (2016). doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.012>.

ROOD, J. I.; ADAMS, V.; LACEY, J.; LYRAS, D.; MCCLANE, B. A.; MELVILLE, S. B.; MOORE, R. J.; POPOFF, M. R.; SARKER, M. R.; SONGER, J. G.; UZAL, F. A.; VAN IMMERSEEL, F. **Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme**. Anaerobe, 53, 5–10. (2018). doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>

ROOD, J. I.; COLE, S. T. **Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens**. Microbiological reviews, 55(4), 621–648. (1991). doi: <https://doi.org/10.1128/mr.55.4.621-648.1991>

RODRIGUES, D.; TEIXEIRA, R.; SHOCKLEY, J. **Inspection agency monitoring of food safety in an emerging economy: A multilevel analysis of Brazil's beef production industry**. International Journal of Production Economics. Volume 214, Pages 1-16, ISSN 0925-5273. (2019). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2019.03.024>.

ROSA, V.P. **Clostridium estertheticum e Clostridium gasigenes: detecção, isolamento, rastreamento e controle no processamento de carne bovina resfriada embalada a vácuo**. Campinas-SP, Brasil, 181p. (PhD Dissertation. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP). (2009).

ROTH, A. V.; TSAY, A. A.; PULLMAN, M. E.; GRAY, J. V. **UNRAVELING THE FOOD SUPPLY CHAIN: STRATEGIC INSIGHTS FROM CHINA AND THE 2007 RECALLS\***. *Journal of Supply Chain Management*, 44, 22-39. (2008)

SABAH, J. R.; THIPPAREDDI, H.; MARSDEN, J. L.; FUNG, D. Y. **Use of organic acids for the control of Clostridium perfringens in cooked vacuum-packaged restructured roast beef during an alternative cooling procedure**. Journal of food protection, 66(8), 1408–1412. (2003). doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.8.1408>

SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Amer Public Health Assn; 5ª edição. 2015.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; DE OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. **Carnes, aves, pescados e derivados. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis.** Campinas, SP: CETEA, 151-174. (2001).

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWNSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN P. M. **Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens.** Emerging infectious diseases, 17(1), 7–15. (2011). doi: <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>.

SILVA, A. R.; PAULO, E. N.; SANT´ANA, A. S.; CHAVES, R. D.; MASSAGUER, P. R. **Involvement of Clostridium gasigenes and C. algidicarnis in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef.** International journal of food microbiology, 148(3), 156–163. (2011). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.016>.

SILVA, A. R.; TAHARA, A. C.; CHAVES, R. D.; SANT´ANA, A. S.; FARIA, J.; MASSAGUER, P. R. **Influence of different shrinking temperatures and vacuum conditions on the ability of psychrotrophic Clostridium to cause 'blown pack' spoilage in chilled vacuum-packaged beef.** Meat science, 92(4), 498–505. (2012). doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.05.017>.

SILVA, J. L. et al. **Behavior of spoilage bacteria and Salmonella enterica subspecies enterica O:4,5 in vacuum-packaged beef during refrigeration.** Cienc. Rural [online]. 2020, vol.50, n.7, e20200090. Epub 08-Jun-2020. ISSN 0103-8478. doi: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200090>.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** São Paulo: Blucher; 5ª edição 2017.  
Site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Serviço de Inspeção Federal - SIF.** Publicado 29/11/2016 19h04, última modificação 14/02/2017 16h49. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif/servico-de-inspecao-federal-sif>. Acesso em: 18 de maio 2022.

SONG, Y.; LIU, C.; FINEGOLD, S. M. **Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children.** Applied and environmental microbiology, 70(11), 6459–6465. (2004). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004>

SPRING, S.; MERKHOFFER, B.; WEISS, N.; KROPPESTEDT, R. M.; HIPPE, H.; STACKEBRANDT, E. **Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of Clostridium frigoris sp. nov., Clostridium lacusfryxellense sp. nov., Clostridium bowmanii sp. nov. and Clostridium psychrophilum sp. nov. and reclassification of Clostridium laramiense as Clostridium estertheticum subsp. laramiense subsp. nov.** International journal of systematic and evolutionary microbiology, 53(Pt 4), 1019–1029. (2003). doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02554-0>

STACKEBRANDT, E.; HIPPE, H. **Taxonomy and systematics.** In *Clostridia Biotechnology and Medical Applications* ed. Hubert Bahl, P.D. pp.19–48. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. (2005).

STACKEBRANDT, E.; KRAMER, I.; SWIDERSKI, J.; HIPPE, H. **Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*.** *FEMS immunology and medical microbiology*, 24(3), 253–258. (1999). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01291.x>

STAGNITTA, P. V.; MICALIZZI, B. **Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina.** *Anaerobe*. 8:253–258. (2002) doi: [10.1006/anae.2002.0433](https://doi.org/10.1006/anae.2002.0433)

SUETIN, S. V.; SHCHERBAKOVA, V. A.; CHUVILSKAYA, N. A.; RIVKINA, E. M.; SUZINA, N. E.; LYSENKO, A. M.; GILICHINSKY, D. A. ***Clostridium tagluense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 6), 1421–1426. (2009). doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002295-0>.

TIZHE J. Q.; BELLO, M.; KABIR, J.; JASINI, A. M.; LAMURDE, J. **Isolation and biochemical identification of *Clostridium perfringens* from raw beef sold in retail outlets in Zaria Metropolis, Nigeria.** *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 4: 23–29 (2015).

UZAL, F. A.; SONGER, J. G. **Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats.** *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 20(3), 253–265. (2008). doi: <https://doi.org/10.1177/104063870802000301>.

USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)

WAMBUI, J.; PUNTENER, S.; CORTI, S.; CERNELA, N.; STEPHAN, R. **Detection of Psychrophilic *Clostridium* spp. Causing "Blown Pack" Spoilage in Meat Juice Samples from Chilled Vacuum-Packed Beef and Lamb Meat Imported from Different Countries to Switzerland.** *J Food Prot.* 2020 Jan;83(1):56-59. doi: [10.4315/0362-028X.JFP-19-321](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-321).

YANG, X.; BALAMURUGAN, S.; GILL, C. O. **Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium.** *International journal of food microbiology*, 128(3), 501–505. (2009). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.024>.

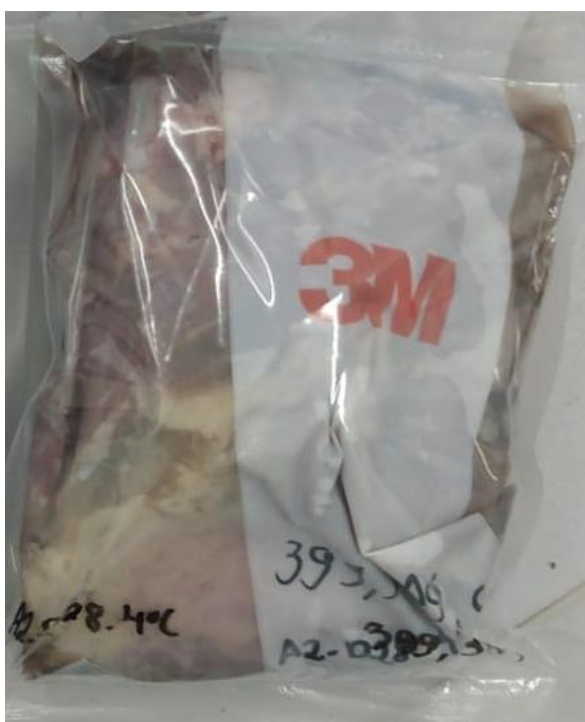
YU, Z.; GUNN, L.; BRENNAN, E.; REID, R.; WALL, P. G.; GAORA, P. Ó.; HURLEY, D.; BOLTON, D.; FANNING, S. **Complete Genome Sequence of *Clostridium estertheticum* DSM 8809, a Microbe Identified in Spoiled Vacuum Packed Beef.** *Front Microbiol.* 2016 Nov 11;7:1764. doi: [10.3389/fmicb.2016.01764](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01764).

## ANEXOS

**Figura 1:** Amostra armazenada a 4 °C analisada no dia 0, sem distensão da embalagem.



**Figura 2:** Amostra armazenada a 4 °C analisada após 28 dias de incubação, sem distensão da embalagem.



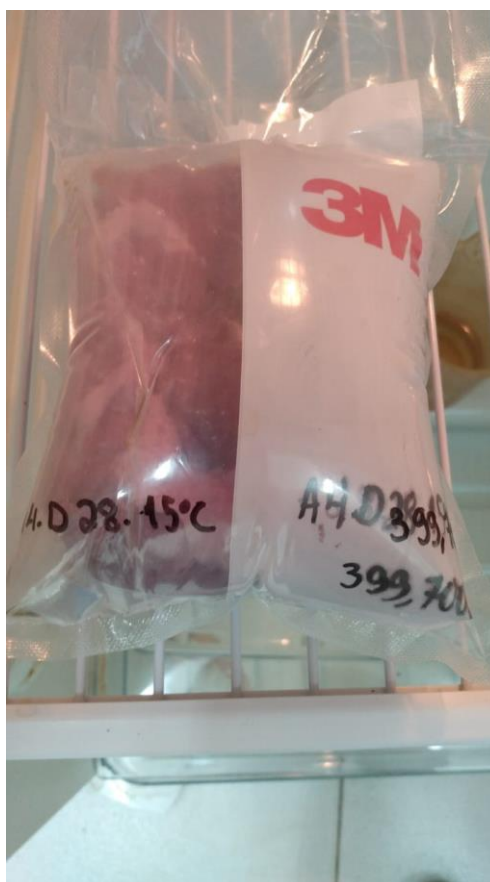
**Figura 3:** Amostra armazenada a 15 °C analisada após 14 dias de incubação, com considerável distensão da embalagem e características repugnantes.



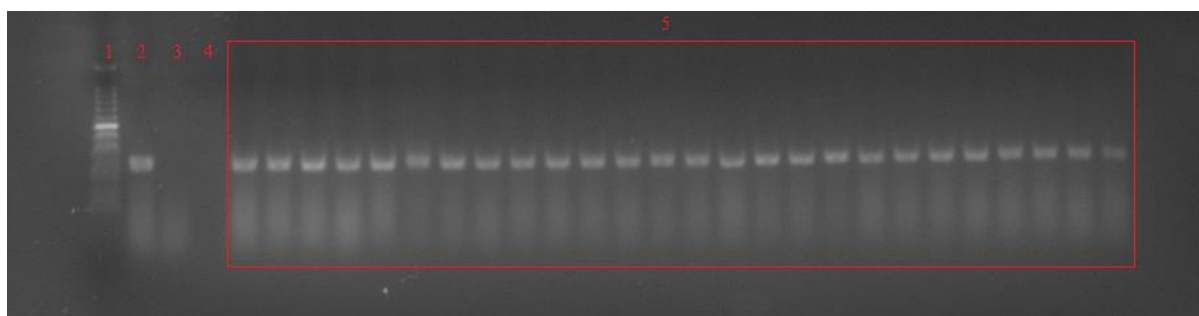
**Figura 4:** Amostra armazenada a 15 °C analisada após 21 dias de incubação, com considerável distensão da embalagem e características repugnantes.



**Figura 5:** Amostra armazenada a 15 °C analisada após 28 dias de incubação, com considerável distensão da embalagem e características repugnantes.

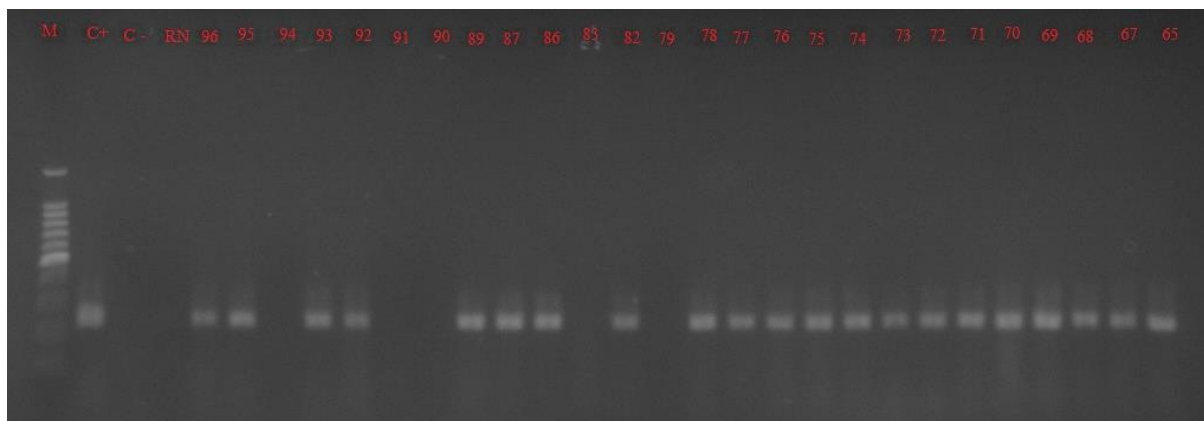


**Figura 6:** Reação em cadeia da polimerase.



1 (Marker 100 pb); 2 (Controle positivo); 3 (Controle negativo); 4 (Reação negativa); 5 (Isolados característicos purificados: produtos amplificados – 232 pb, confirmados como *Clostridium* cluster I ).

**Figura 7:** Reação em cadeia da polimerase.



M (*Marker* 100 pb); C+ (Controle positivo); C - (Controle negativo); RN (Reação negativa); 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 82, 86, 87, 89, 92, 93, 95 e 96 (Isolados característicos purificados: produtos amplificados – 232 pb, confirmados como *Clostridium* cluster I ); 79, 83, 90, 91 e 94 (Isolados característicos purificados: sem formação de bandas).

## ANEXO A - Normas

Texto ou documento **não elaborado pelo autor**, que serve de fundamentação, comprovação e ilustração.