

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FLÁVIA ISABEL DA ROCHA OLIVEIRA

***CLOSTRIDIUM ESTERTHETICUM* EM LEITE CRU E EM QUEIJOS
PARMESÃO E PROVOLONE**

Goiânia
2007

FLÁVIA ISABEL DA ROCHA OLIVEIRA

***CLOSTRIDIUM ESTERTHETICUM* EM LEITE CRU E EM QUEIJOS
PARMESÃO E PROVOLONE**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

Co-orientador (a): Prof. Dr^a Iolanda Aparecida Nunes

Goiânia
2007

FLÁVIA ISABEL DA ROCHA OLIVEIRA

***CLOSTRIDIUM ESTERTHETICUM* EM LEITE CRU E EM QUEIJOS
PARMESÃO E PROVOLONE.**

Dissertação defendida e aprovada em 26 de outubro de 2007, pela Banca Examinadora
constituída pelos membros:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Linhares - UFG

Prof. Dr. Celso José de Moura - UFG

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita - UFG
(Orientador)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Arivaldo e
Léa, pelo incentivo e amor constante.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor e consumidor da minha fé. A quem devo toda honra e glória. Agradeço por cada passo que Ele me conduziu, por cada pessoa que colocou em minha vida e por me conceder saúde e condições financeiras para a realização desta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Goiás, à Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Ao Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária da UFG.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais Arivaldo Oliveira e Léa da Rocha Oliveira, irmãos Arivaldo O. Júnior, Amanda da R. Oliveira e Daniel da R. Oliveira e cunhados Márcia C. Araújo e Ricardo Cardoso por estarem sempre ao meu lado, incentivando e apoiando minhas decisões. Muito obrigada! Vocês são fundamentais na minha vida!

Ao Rogério B. S. Araújo meu amigo e companheiro. Como você foi e é importante na realização desse sonho. Você que está ao meu lado em cada momento de desânimo, cansaço, mas também nos de alegria. Obrigada pela ajuda, compreensão, carinho e amor!

Ao professor Dr. Albenones José de Mesquita, obrigada pela confiança na execução deste projeto, amizade, carinho e pelas orientações. Agradeço à professora Dra. Iolanda Aparecida Nunes pelo auxílio, correções e ensinamentos dispensados a mim. Tenho certeza que aprendi muito com vocês!

À amiga e fiel companheira Ursula Nunes Rauecker, nem sei se conseguirei expressar o quanto você foi importante. Você que me deu forças, ensinando, auxiliando, acompanhando-me em vários “experimentos”, sem impor limites para ajudar. Obrigada!

À Thays de Lima Dias que me acompanhou desde o início, sofrendo com várias tentativas, mas também se alegrando com as vitórias. Uma amiga muito especial. Obrigada!

À Livia Mara Felipe pela imensa ajuda na finalização deste trabalho, principalmente na execução do seqüenciamento. Você que se tornou uma grande amiga! Como sou grata!

Aos amigos e colegas Leonardo França, Thiago Vilela Del’Acqua, Adriano Q. Mesquita, Laura Cristina V. Resende, Joice Vinhal, Renan Bertazzi e Oyama Rodrigues da Silva pela companhia, pelos momentos alegres e auxílios.

Àqueles que sempre me ajudaram com conselhos, disponibilizando materiais indispensáveis para este trabalho, pela amizade e carinho. Vocês, Sandra Queiroz Porto de Mesquita, Winder Macusuel Borges Oliveira e Cíntia Silva Minafra e Rezende.

Ao professor Dr. Guido Fontgalland Linhares por disponibilizar as fotos dos géis de eletroforese com tanto carinho e dedicação.

À Karine Oliveira Coelho e Tainá Leite de Almeida pelo auxílio na coleta das amostras de leite, as quais foram de grande importância.

Ao professor Robson Maia Geraldine pela grande ajuda na análise e interpretação dos dados.

À Ângela Patrícia Santana da Universidade de Brasília, pela disponibilidade de realizar o seqüenciamento das amostras.

Aos colaboradores, estagiários e mestrandos do Centro de Pesquisa em Alimentos, Sr. Nilson Nunes Ribeiro e Sr. José Vieira, Wilson C. Ricardo, Fredsson M. Silva, Euza R. Silva, Neuza D. S. Souza, Liliane S. Santos, Sandra M. dos Santos, Tatiane E. Parreira, Maria Magali de Souza, Rosangela N. Carvalho, Gisele do N. Moreira, Silmara D. Fernandes, Leandro Augusto Souza, Adrielle N. Silva, Kesllye Karole Silva, Lisbônea Gomes (Liz), Rodrigo A. Oliveira, Rodrigo Balduino, Fabíola R. Santos, Carlos Henrique G. Moreira, “Buxexa”, Suzy Darlen S. Almeida e Camila Silveira de Melo que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável com sua amizade, sorriso e carinho.

Aos Professores Antônio Nonato Oliveira, Edmar Soares Nicolau e Moacir Evandro Lage pela atenção e carinho.

Aos meus colegas de pós-graduação Henrique E. Amorim, Marília M. Guimarães, Lorena S. Rocha, Mayra Conceição P. Martins, Letícia Fleury Viana, Cláudia L. Munhoz e, em especial à grande amiga Ana Maria da S. Rabelo. Como foi bom este tempo que passamos juntos. Vocês fazem parte desta realização!

Aos professores Maria Célia L. Torres, Márcio Caliari, Manoel S. Soares Júnior, Celso José de Moura, Maria Margareth V. Naves, Maria Sebastiana Silva, Mara R. Silva, Raquel A. C. Santiago, Rosangela Vera e Miriam F. A. Silveira por todo ensinamento, carisma e amizade.

Aos formandos de engenharia de alimentos UFG/2006 pelos momentos que passamos juntos durante o Estágio Docência.

Aos amigos que, mesmo distante, sempre me apoiaram, Estela do Lago, Fabíola Marques, Flávia Marques, Flávia Rodrigues, Ângela Rocha Silva Sousa, Isaac Nogueira, Sara Nogueira, Clarissa Damiani, Sther Lenza e Maria do Livramento (“Lili”). Obrigada!

EPÍGRAFE

*“Tu és digno, Senhor e Deus nosso, de receber
a glória, a honra e o poder, porque todas as
coisas tu criaste, sim, por causa da tua vontade,
vieram a existir e foram criadas”.*

(Apocalipse 4:11)

RESUMO

A deterioração de queijos semicozidos e cozidos ou semiduros e duros, conhecida como tufamento tardio, tem sido o foco de vários estudos. Alguns microrganismos já foram relacionados com esta deterioração incluindo algumas espécies de *Clostridium*, como *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* e *C. beijerinckii*. Uma nova espécie, *C. estertheticum*, está sendo incriminada na deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo, que apresenta características semelhantes ao tufamento tardio em queijos, como produção de gás com distensão da embalagem, forte odor de ranço e presença de ácidos butíricos. No entanto, não havia nenhum relato sobre a ocorrência de *C. estertheticum* em leite cru e queijos. O presente trabalho avaliou 32 amostras de leite cru provenientes de propriedades rurais de Goiás e 95 de queijos parmesão e provolone comercializados no mercado varejista de Goiânia, produzidos em diferentes Estados do Brasil. *C. estertheticum* foi detectado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase com dois pares de *primers*, RF/RR e 16SEF/16SER. O efeito do enriquecimento não-seletivo das amostras em caldo BHI foi avaliado em três períodos de incubação, cinco, dez e 30 dias, a 10°C em anaerobiose. O DNA genômico foi extraído seguindo a metodologia do fenol:clorofórmio. Os resultados obtidos revelam a ocorrência de *C. estertheticum* em amostras de leite cru (34,4%) e de queijos parmesão e provolone (17,9%). A maior positividade foi obtida nos queijos parmesão e provolone com sinais de deterioração (50,0%) e normais (29,6%) e no provolone com sinais de deterioração (25,0%). *C. estertheticum* foi detectado com os dois pares de *primers* utilizados na amplificação, sendo a totalidade de positivos obtida somente quando se associou os dois pares. O pré-enriquecimento para extração do DNA genômico influenciou substancialmente na detecção do microrganismo sendo o período de 10 dias, o que proporcionou melhores resultados para o par RF/RR. *C. estertheticum* foi encontrado em amostras de queijos provenientes de todos os Estados analisados, e em amostras de leite cru colhidos em Goiás, o que indica sua disseminação no Brasil.

Palavras-chaves: produtos lácteos, deterioração de queijo, PCR, *Clostridium*.

ABSTRACT

The spoilage of semicooked and cooked cheeses and semihard and hard cheeses, known as late blowing, has been the focus of some studies. Some microorganisms already had been related with this spoilage including some species of *Clostridium*, as *C. tyrobutiricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* and *C. beijerinckii*. A new species, *C. estertheticum*, is being incriminated in the spoilage of cooled meats packed the vacuum, which presents similar characteristics to the late blowing in cheeses, as gas production with blowing of the packing, fort flavor of rancid and presence of acid butyl. However, did not have a story on the occurrence of *C. estertheticum* in raw milk and cheeses. The present work evaluated 32 samples of raw milk proceeding from country properties of Goiás and 95 samples of cheeses commercialized parmesan and provolone in the retail market of Goiânia, produced in different States of Brazil. *C. estertheticum* was detected using of the Polimerase Chain Reaction with two pairs of *primers*, RF/RR and 16SEF/16SER. The effect of the not-selective enrichment of the samples in broth BHI was evaluated, in three incubation periods, five, ten and 30 days 10°C in anaerobes. The genomics DNA was extracted following the methodology fenol:clorofórmio. The gotten results disclose to the occurrence of *C. estertheticum* in samples of raw milk (34,4%) and samples of cheeses parmesan and provolone (17,9%). The highest leves of *C. estertheticum* was gotten in the cheeses parmesan and provolone with signals of spoilage (50,0%) and normal (29,6%) and in provolone with spoilage signals (25,0%). *C. estertheticum* was detected with the two pairs of *primers* used in the amplification, being the totality of positives only gotten when it associated the two pairs. The daily pay-enrichment for extraction of the genomics DNA substantially influenced in the detention of the microorganism being the period of 10 days, what it provided better resulted for pair RF/RR. *C. estertheticum* was found in samples of cheeses proceeding from all the analyzed States, and in raw milk samples harvested in Goiás, what it indicates its dissemination in Brazil.

Word-keys: dairy products, spoilage of cheese, PCR, *Clostridium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral de produção de queijo.....	16
Figura 2. Fontes possíveis de contaminação do leite com esporos de <i>Clostridium</i>	21
Figura 3. Fotomicrografia de contraste de fase do <i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i> (a) e <i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i> (b)	25
Figura 4. Distribuição das amostras de queijos parmesão e provolone segundo o Estado de localização das indústrias.....	31
Figura 5. Mapa do Estado de Goiás destacando os Municípios de procedência das amostras de leite cru.	31
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,0% de produtos de <i>C. estertheticum</i> em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone, com os pares de <i>primers</i> RF/RR (641pb) e 16SEF/16SER (790pb). Canaletas 01 e 11 padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 02 e 10 controles positivos (DSM 8809); 03 amostra positiva para o par 16SEF/16SER; 04 e 05 controle negativo para o par 16SEF/16SER; 06 controle negativo para o par RF/RR; 07 a 09 amostras positivas para o par RF/RR.	43
Figura 7. Distribuição de <i>C. estertheticum</i> no total de amostras analisadas, segundo o uso individual, simultâneo e independente dos pares de <i>primers</i> RF/RR e 16SEF/16SER.	45
Figura 8. Distribuição de <i>C. estertheticum</i> em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone, segundo o uso individual, simultâneo e independente dos pares de <i>primers</i> RF/RR e 16SEF/16SER.....	45
Figura 9. Distribuição de <i>C. estertheticum</i> detectados por PCR segundo os Municípios goianos de colheita das amostras de leite cru. Goiânia-GO, 2007.....	56
Figura 10. Concentração de <i>amplicons</i> de <i>C. estertheticum</i> . Canaleta 1 padrão de peso molecular Low DNA Mass Ladder, 2 <i>amplicon</i> de 790 pb (par 16SEF/16SER e 3 <i>amplicon</i> de 641 pb (par RF/RR).	57
Figura 11. Homologia de 99% resultante do alinhamento no programa BLAST (GENBANK, 2007) entre o resultado do seqüenciamento e a seqüência de referência para <i>C. estertheticum</i> (nº de acesso S46734) realizada com o par de <i>primers</i> RF/RR (HELPS; HARBOUR; CORRY, 1999).	58
Figura 12. Homologia de 99% resultante do alinhamento no programa BLAST (GENBANK, 2007) entre o resultado do seqüenciamento e a seqüência de referência para <i>C. estertheticum</i> (nº de acesso X68181) realizada com o par de <i>primers</i> RF/RR (HELPS; HARBOUR; CORRY, 1999).	58
Figura 13. Homologia de 99% resultante do alinhamento no programa BLAST (GENBANK, 2007) entre o resultado do seqüenciamento e a seqüência de referência para <i>C. estertheticum</i> (nº de acesso X68181) realizada com o par de <i>primers</i> 16SEF/16SER (BRODA; BOEREMA; BELL, 2003)	59

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1. Distribuição de amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone segundo a apresentação do produto. Goiânia - GO, 2007.....	29
Tabela 2. Misturas de reação de amplificação de PCR e concentrações finais de reagentes, segundo os pares de <i>primers</i> utilizados. Goiânia – GO, 2007.	35
Tabela 3. Distribuição de <i>C. estertheticum</i> em amostras de leite cru, queijos normais e queijos com sinais de deterioração, segundo as fontes de detecção. Goiânia-GO, 2007.....	37
Tabela 4. Distribuição de <i>C. estertheticum</i> em amostras de queijos normais e com sinais de deterioração, segundo o tipo de queijo. Goiânia-GO, 2007.....	39
Tabela 5. Detecção de <i>C. estertheticum</i> em leite cru e em queijos parmesão e provolone, segundo os pares de <i>primers</i> utilizados para amplificação. Goiânia-GO, 2007.	42
Tabela 6. Detecção de <i>C. estertheticum</i> em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone pré-enriquecidas e não enriquecidas. Goiânia-GO, 2007.	47
Tabela 7. Detecção de <i>C. estertheticum</i> em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone submetidas ao pré-enriquecimento em caldo não seletivo, segundo os períodos de incubação. Goiânia-GO, 2007.	50
Tabela 8. Frequência de <i>C. estertheticum</i> em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone, sem e com pré-enriquecimento, segundo os pares de <i>primers</i> utilizados na amplificação e os períodos de incubação. Goiânia-GO, 2007.	53
Quadro 1. Relação das amostras positivas para <i>C. estertheticum</i> , segundo a fonte, aspecto do produto, pares de <i>primers</i> utilizados na amplificação e período de pré-enriquecimento.....	48

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Fluxograma de produção dos queijos parmesão e provolone.....	15
2.2	Defeitos nos queijos parmesão e provolone.....	18
2.2.1	Tufamento tardio de queijos duros e semiduros	19
	• <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	20
	• <i>Clostridium butyricum</i>	22
	• <i>Clostridium sporogenes</i>	22
	• <i>Clostridium beijerinckii</i>	23
	• <i>Clostridium estertheticum</i>	24
2.3	Deteção de <i>C. estertheticum</i> pela reação em cadeia da polimerase.....	26
3.	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Amostragem	29
4.2	Colheita das amostras	32
4.3	Deteção Molecular de <i>C. estertheticum</i>	33
4.3.1	Procedimento de preparo das amostras	33
4.3.2	Extração do DNA genômico	34
4.3.3	Protocolos para o PCR.....	34
4.4	Confirmação da identidade dos produtos de amplificação.....	36
4.5	Análise estatística.....	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Deteção de <i>C. estertheticum</i> em leite cru e em queijos.....	37
5.2	Deteção de <i>C. estertheticum</i> segundo os pares de <i>primers</i> e as fontes.....	40
5.3	Avaliação do efeito do pré-enriquecimento não seletivo na deteção de <i>C. estertheticum</i> pela técnica de PCR.....	46
5.4	Avaliação dos períodos de incubação na deteção de <i>C. estertheticum</i> por meio da técnica de PCR.....	49
5.5	Distribuição de <i>C. estertheticum</i> segundo os estabelecimentos de procedência e a origem geográfica das amostras.....	54
5.6	Confirmação da identidade dos produtos de amplificação.....	57
6.	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES.....	66

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado como um dos alimentos mais completos, por ser de grande valor nutritivo, fornecendo macro e micronutrientes para crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde do homem. Segundo o Anualpec (2006) a produção de leite no Brasil cresceu vertiginosamente nas últimas décadas, atendendo atualmente o consumo interno e exportando o excedente. A presença do leite no mercado internacional gera novas perspectivas para o produtor, principalmente em relação aos ganhos financeiros decorrentes da elevação dos preços e à qualidade nutricional e microbiológica da matéria-prima, o que já foi revolucionado com a Instrução Normativa Nº 51 (IN51) através da definição dos parâmetros de qualidade para a cadeia produtiva.

Desde 2000, o Brasil tem produzido anualmente, em torno de 20 bilhões de litros de leite, sendo Goiás um dos maiores produtores, com consumo nacional de, em média, 1,5 bilhões de litros de leite. Com relação aos derivados, o Brasil está entre os três maiores produtores de queijo, com 495 milhares de toneladas, consumindo, em torno de 2,6 kg/pessoa/ano. Segundo o Anualpec (2006) o Brasil exportou em 2005, cerca de 1,9 mil toneladas de leite e sete mil toneladas de queijo.

Desta forma é importante destacar que as exigências quanto à qualidade do queijo e conseqüentemente da matéria prima é fundamental não só em relação à saúde do consumidor, mas também ao produtor que, na maioria das vezes, obtém o sustento de sua família da comercialização destes produtos. Assim, é imprescindível destacar a necessidade de controle de qualidade, higiênico-sanitária, no intuito de obter um produto apto para o consumo, sem perigo para a saúde do consumidor e sem defeitos.

Os queijos podem apresentar vários defeitos perceptíveis pelo consumidor somente no momento de uso, corte ou degustação, porém, outros são visualmente notáveis. Assim podem ser citados: alteração de sabor, problemas de textura e consistência, manchas e descoloração, trincas, ausência de derretimento, olhaduras indesejáveis ou ausência delas e, ainda, fermentações indesejáveis que podem provocar o tufamento tardio.

Deteriorações como tufamento tardio têm ocorrido com grande frequência em produtos lácteos, principalmente em queijos duros e semiduros. Tufamento tardio se diferencia do tufamento precoce, dentre outros fatores, pelo período de manifestação dos sinais e tipo de microrganismo causador da deterioração.

O tufamento precoce ocorre rapidamente nos queijos processados e contaminados por coliformes. Já o tufamento tardio provocado pela contaminação por clostrídios manifesta-se em período de tempo maior. Geralmente o tufamento tardio gera um prejuízo para o laticínio ou queijaria, pois o produto torna-se impróprio para o consumo devido à formação de odor e sabor indesejáveis e deformação do mesmo, que se apresenta “inchado”, com grandes olhaduras e trincas ou rachaduras.

As espécies bacterianas envolvidas em casos de tufamento tardio são *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* e *C. beijerinckii*. Provavelmente, demoram mais tempo para se multiplicarem devido ao tempo de geração desses microrganismos, o que pode ocorrer quando o produto já está no ponto de venda. Como esses microrganismos são anaeróbios, os queijos duros e semiduros são os mais propícios a esta deterioração por criarem em seu interior uma condição de anaerobiose.

Outras espécies de *Clostridium* têm sido detectadas em carnes refrigeradas embaladas a vácuo e provocam na carne alterações semelhantes ao tufamento tardio em queijos. Dentre essas espécies pode-se citar *C. estertheticum*. Pouco se sabe sobre estes microrganismos, mas estudos revelam que estão presentes em fezes, na superfície de cortes cárneos e carcaças e em ambientes de matadouros-frigoríficos, como câmaras frias e ralos.

C. estertheticum é um microrganismo deteriorante que apresenta faixa ótima de temperatura inferior à das espécies até então incriminadas em casos de tufamento tardio de queijos. Portanto, torna-se importante comprovar sua presença também em leite e produtos lácteos no intuito de adotar medidas de higiene e sanitização adequadas, visando seu controle nas plantas industriais de laticínios.

Os métodos convencionais de isolamento e identificação do microrganismo são demorados e de difícil execução. Técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizadas com frequência e sucesso, devido à elevada especificidade, sensibilidade e rapidez quando comparadas com os métodos convencionais.

Diante do exposto, propôs-se neste estudo verificar a ocorrência de *C. estertheticum* em leite cru, queijos duros e semiduros. Partiu-se do princípio de que se o microrganismo está presente em fezes de animais e pele do animal, portanto pode também estar presente no leite cru. Além disso, como é esporulado, pode sobreviver ao tratamento térmico do leite para a produção de queijos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro de leite ou leite reconstituído ou de soros lácteos, coagulados, com ou sem adição de aditivos. Ainda segundo esta Portaria, queijo fresco é o produto que está pronto para o consumo logo após sua fabricação e queijo maturado aquele que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997a).

Dentre os queijos maturados estão os queijos parmesão e provolone. O queijo parmesão é obtido de leite cru ou pasteurizado, de massa cozida, prensado e maturado por, no mínimo, seis meses. É classificado como queijo duro (BRASIL, 1952), de baixa umidade, semi-gordo e maturado (BRASIL, 1997b).

De origem italiana, as principais características do queijo parmesão são: baixo teor de umidade e textura granular, o que lhe confere em algumas regiões, o nome de queijo Grana. Apresenta-se sob forma cilíndrica, com faces planas, crosta grossa (4 a 8 mm), bem formada e lisa. A massa é dura, compacta e quebradiça, de untura seca, cor amarelo-palha, odor e sabor picante e forte (BRASIL, 1952; ALBUQUERQUE, 2002). Segundo a Portaria nº 353, de 1997, do MAPA, o queijo parmesão pode pesar de cinco a 10 kg e, até a expedição, deve ser armazenado a temperatura inferior que 18°C (BRASIL, 1997b).

O queijo provolone é um queijo de massa filada, originário da Itália. É também fabricado em vários países do mundo, inclusive no Brasil (ALBUQUERQUE, 2002). Obtido de leite cru ou pasteurizado, não é prensado e pode ser comercializado fresco ou maturado. Quando fresco, deve ser consumido até 20 dias após a fabricação (BRASIL, 1952). Possui diversos formatos, sendo o mais comum o de um longo cilindro, com peso variando de quatro a cinco quilos, podendo se apresentar também, no formato de uma pêra. Pode ser defumado, o que lhe confere coloração e sabor especiais. Sua maturação varia de dois a quatro meses e possui sabor pronunciado (BRASIL, 1952; ALBUQUERQUE, 2002). Quando frescos, devem pesar de 500 g a 2 kg e maturados, de 2 a 8 kg. Sua crosta deve ser firme, lisa, resistente e de cor amarelo castanho devido à defumação. Sua consistência é semidura, textura fechada, coloração interna amarelo palha, odor forte e sabor levemente picante (BRASIL, 1952).

De acordo com Albuquerque (2002), uma boa parte da produção de queijo parmesão é destinada à ralação. No entanto, a legislação brasileira permite a obtenção de queijos ralados

somente a partir de queijos aptos para o consumo humano, mas permite ralar os julgados não adequados para venda ao público, tais como aqueles que apresentam falhas morfológicas ou de comercialização, desde que não comprometam a qualidade do produto final (BRASIL, 1997c).

2.1 Fluxograma de produção dos queijos parmesão e provolone

A Figura 1 representa o fluxograma de produção geral de queijos. No presente trabalho serão destacadas apenas as particularidades referentes à produção dos queijos parmesão e provolone.

Leite Integral

Para a elaboração de queijo deve-se utilizar leite de boa qualidade, que envolve desde sua composição à microbiota bacteriana e sua capacidade para fermentação e coagulação (CHAPMAN; SHARPE, 1987; DUMAIS; BLAIS; CONRAD, 1991). Esses fatores interferem tanto no rendimento quanto na microbiota, pois a qualidade microbiológica dos produtos lácteos é influenciada pela carga microbiana do leite cru, das condições de processamento e contaminação pós-pasteurização (RICHTER; LEDFORD; MURPHY, 1976).

O leite cru proveniente de animais sadios contém reduzida quantidade de microrganismos, sendo os mais comuns os gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium* (PERRY, 2004). No entanto, o leite pode ser contaminado com microrganismos da pele da vaca, do ambiente e dos utensílios e equipamentos higienizados inadequadamente utilizados na ordenha, que incluem bactérias Gram-negativas como os coliformes e Gram-positivas como as ácido-láticas, *Bacillus* e *Clostridium* (RICHTER; LEDFORD; MURPHY, 1976; CHAPMAN; SHARPE, 1987).

Corte, Cocção da coalhada e Dessoramento

Uma das particularidades dos queijos parmesão e provolone ocorrem nas etapas de corte e cocção da coalhada e no dessoramento. Na elaboração de queijos mais duros, a coalhada é predominantemente enzimática e corte intenso no intuito de obter proporções menores, as quais condicionam a intensidade do dessoramento. Na cocção da coalhada, a temperatura elevada favorece a formação de ligações intermicelares com a conseqüente

retração do coágulo, podendo chegar até 55 e 60°C. Desta forma, o dessoramento torna-se mais intenso (ORDOÑEZ, 2005).



Figura 1. Fluxograma geral de produção de queijo.

Fonte: Ordoñez, 2005 (Adaptado).

Filagem

Dentre os queijos estudados apenas o provolone é submetido ao processo de filagem (Figura 1). A filagem ocorre quando a massa perde a maior parte do cálcio que integraliza a matriz protéica desde a coagulação. A perda de cálcio ocorre à medida que aumenta a acidificação da massa, ou seja, entre pH de 4,8 a 5,5. O ponto ideal da massa ocorre quando o pH encontra-se na faixa citada, em média 5,1 - 5,2, momento no qual a mesma encontra-se moderadamente mineralizada como paracaseinato bicálcico, apresentando boa elasticidade e à temperatura de 55 a 58°C (FURTADO, 1997).

Maturação

Os queijos maturados diferenciam-se dos frescos, essencialmente, pelas complexas transformações bioquímicas que ocorrem na maturação, de forma progressiva e por um longo tempo. Neste processo os componentes da coalhada são transformados em diferentes produtos mais solúveis. A natureza destes novos produtos, sua diversidade e proporções relativas fazem com que cada queijo tenha seu sabor e aroma típicos, textura e consistência características e diferentes das demais variedades (SPREER, 1991).

Os períodos de maturação podem variar desde uma ou duas semanas até um ano ou mais. Geralmente os queijos mais maturados, com sabor aguçado, requerem uma maturação de um ano ou mais. As condições de umidade e temperatura durante este processo dependem do tipo de queijo, sendo que para a maioria dos duros utiliza-se umidade baixa, aumentando assim a atividade enzimática interna, ao mesmo tempo em que se previne o crescimento microbiano superficial (SILIKER, 1980).

Os queijos semiduros, como o provolone, são fabricados com coalhadas mais firmes e umidade de 45 - 50%. Os responsáveis pela maturação são as bactérias, as quais diminuem o número após dois a três meses de maturação. Os queijos duros, como o parmesão, são produzidos com coalhadas firmes, relativamente desidratadas e 35 - 45% de umidade. O processo de maturação é lento e ocorre por meio de bactérias tendo duração de três a 12 meses (CHAPMAN; SHARPE, 1987).

Os componentes mais envolvidos na maturação são a lactose, as proteínas e a gordura, por meio das reações de glicólise, proteólise e lipólise, respectivamente (DUMAIS; BLAIS; CONRAD, 1991). A glicólise é caracterizada pela acidificação do leite e da coalhada devido à fermentação da lactose em ácido láctico por cepas selecionadas de bactérias lácticas, denominadas cultivos iniciadores. Geralmente essa fermentação é realizada por bactérias lácticas homofermentativas, cujo metabólito final majoritário é o ácido láctico. Quando há

presença de microrganismos heterofermentativos são formados compostos secundários como o dióxido de carbono (CO₂), o ácido acético e o etanol, sendo que alguns são indesejáveis por produzirem defeitos nos queijos (ORDOÑEZ, 2005).

O ácido láctico resultante da fermentação da lactose pode se combinar com o cálcio e formar o lactato. Tanto o ácido láctico quanto o lactato podem ser decompostos por bactérias desejáveis e indesejáveis, por meio da fermentação propiônica formando ácido propiônico, acético e CO₂ ou pela fermentação butírica formando ácido butírico, CO₂ e H₂, alterando o aroma e causando o tufamento tardio nos queijos (DUMAIS; BLAIS; CONRAD, 1991).

A proteólise é considerada como um fenômeno de grande relevância, que ocorre durante a maturação, pois afeta tanto a textura como o sabor e o aroma. É um processo gradual que começa com a ruptura da molécula protéica (ORDOÑEZ, 2005), que se inicia na salmoura, primeiramente devido aos bolores e leveduras que crescem na superfície do produto, mantendo durante a maturação (SPREER, 1991).

Na proteólise ocorre a fragmentação da molécula original em polipeptídeos de tamanhos diversos até a formação de oligopeptídeos e de aminoácidos livres. Estes compostos podem, junto com substâncias geradas durante a glicólise e a lipólise, participarem do sabor e do aroma dos produtos ou permanecer no meio disponíveis para sofrer transformações posteriores, produzindo outros compostos aromáticos e de sabor (ORDOÑEZ, 2005).

A lipólise é a reação na qual as lipases transformam os triglicerídeos em glicerídeos parciais liberando ácidos graxos. A lipólise lenta e parcial de alguns componentes da gordura conduz à formação de compostos que intensificam o aroma de alguns queijos de longa maturação. Quando ocorre uma liberação excessiva de ácidos graxos, em particular do ácido butírico, graves defeitos de aroma podem ocorrer no queijo (DUMAIS; BLAIS; CONRAD, 1991). As modificações sofridas pelo material lipídico durante a maturação do queijo não afetam a textura, mas sim o sabor e o aroma do produto final (ORDOÑEZ, 2005).

2.2 Defeitos nos queijos parmesão e provolone

Diversos tipos de defeitos podem ocorrer nos queijos. Alguns decorrentes da fabricação devido à tecnologia inadequada, outro, da má qualidade da matéria prima e ingredientes, ou ainda, dos tratamentos físicos inadequados aplicados ao queijo como, prensagem, cuidados na maturação e controle das temperaturas de maturação e estocagem (FURTADO, 1991). Os defeitos geralmente produzem alterações físicas, químicas e

organolépticas tais como: sabor anormal de ranço e odor pútrido. Os tipos de microrganismos implicados nas alterações de queijos maturados restringem àqueles que oxidam o lactato e aos que utilizam as proteínas e gorduras, assim como os produtos de sua degradação. Os bolores, as leveduras e os anaeróbios esporulados estão implicados, com maior frequência, nas deteriorações (SILIKER, 1980).

De acordo com Furtado (1991) um dos defeitos mais temidos, o tufamento, ocorre ao final da fabricação (prensagem ou salga) ou no decorrer da maturação. O primeiro caso é conhecido como tufamento precoce, provocado por bactérias do grupo coliforme. No segundo, tufamento tardio, estão envolvidas as bactérias do gênero *Clostridium*, porém seu controle é mais complexo do que o anterior (FURTADO, 1991).

2.2.1 Tufamento tardio de queijos duros e semiduros

A fermentação ácido-butírica, comumente conhecida como tufamento tardio, constitui um defeito frequentemente observado nos queijos semiduros e duros e de maturação prolongada (FURTADO, 1985). Esse defeito é provocado pela presença de esporos de clostrídios que podem germinar, multiplicar e, assim, produzir gás, gerando consideráveis perdas do produto (COCOLIN et al., 2004; PERRY, 2004), representando um elevado impacto econômico na produção de queijos (LE BOURHIS et al., 2005).

O fundamento bioquímico desse defeito baseia-se na fermentação do ácido láctico em ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrogênio. A formação de ácido butírico confere ao queijo um *flavor* de ranço e a presença dos gases CO₂ e H₂ à formação de olhaduras, que podem, em casos extremos, provocar ruptura do queijo, causando rachaduras ou trincas (LE BOURHIS et al., 2005). O gás carbônico, bastante solúvel em água, só aparece como olhaduras no queijo depois de saturar completamente o meio aquoso em que está dissolvido. Já o hidrogênio, que não é solúvel em água, provoca a formação imediata de olhaduras que aumentam de tamanho à medida que o defeito se manifesta mais precocemente no queijo (FURTADO, 1991 e 2005; PERRY, 2004).

Geralmente, o tufamento manifesta-se no período de dez dias até oito semanas após a fabricação do produto, pois os esporos só germinam sob certas condições, tais como: após o abaixamento do potencial de oxirredução do queijo ou, antes da distribuição uniforme do sal (BERESFORD et al., 2001; FURTADO, 2005). Os queijos apresentam-se bastante “inchados”, com áreas descoradas e macias, odor desagradável e sabor estranho. Internamente são observadas olhaduras grandes e irregulares na massa, resultantes do processo fermentativo que leva à produção de hidrogênio (MESQUITA et al., 2001).

Bactérias esporogênicas do gênero *Clostridium* que sobrevivem ao processo de pasteurização têm sido apontadas como responsáveis pela contaminação do leite (FURTADO, 1991; INGHAM et al., 1998) e como a principal causa da contaminação dos queijos (MESQUITA et al., 2001). Vários autores (KLIJN et al., 1995; MESQUITA et al., 2001; COCOLIN et al., 2004; LE BOURHIS et al., 2005) são unânimes em afirmar que a matéria-prima contamina-se principalmente na ordenha, sendo a silagem de baixa qualidade microbiológica uma das principais fontes. Na Figura 2 são apresentadas as principais fontes de contaminação do leite com esporos de *Clostridium*.

As espécies de *Clostridium* que têm sido incriminadas como causadoras do tufamento tardio são *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* e *C. beijerinckii* (JONSSON, 1990; INGHAM et al., 1998; KLIJN et al., 1995; PERRY, 2004; LE BOURHIS et al., 2005). Esses microrganismos são bastonetes móveis, Gram-positivos, medem de 0,8 a 6,0 μm de comprimento e crescem em uma faixa de temperatura ideal de 32 a 37°C e de pH entre 6,8 e 7,0 (FURTADO, 1991). Todas essas espécies são capazes de produzir ácido butírico e gás hidrogênio em vários meios de cultivo artificiais (KLIJN et al., 1995).

- *Clostridium tyrobutyricum*

É uma bactéria Gram-positiva, β -hemolítica, móvel, anaeróbia, formadora de esporos ovais e subterminais (HERMAN; BLOCK; WAES, 1995; SNEATH, 1986). É considerada por vários autores como o principal organismo responsável pelo tufamento tardio de queijos semiduros e duros (JONSSON, 1990; HERMAN; BLOCK; WAES, 1995; INGHAM et al., 1998; SU; INGHAM, 2000), sendo a sua presença um pré-requisito para a ocorrência da fermentação ácido-butírica em queijos (KLIJN et al., 1995; LE BOURHIS et al., 2007).

Esse microrganismo fermenta ácido láctico para produzir ácido butírico, dióxido de carbono e hidrogênio. As células vegetativas fermentam lactato (SU; INGHAM, 2000) para produzir CO_2 , H_2 , ácido acético e ácido butírico (MESQUITA et al., 2001). Os gases liberados causam o tufamento no queijo, enquanto o ácido butírico acima da concentração crítica de 200 mg/L confere sabor desagradável (LE BOURHIS et al., 2005).

A faixa de temperatura de multiplicação do *C. tyrobutyricum* ocorre entre 30 e 37°C, sendo ótima de 25°C. Sua multiplicação é estimulada pela fermentação de carboidratos, mas inibida por 6,5% de NaCl ou 20% de bile. A cultura de *C. tyrobutyricum* não é tóxica para camundongos, nem patogênica para humanos e outros animais (SNEATH, 1986).

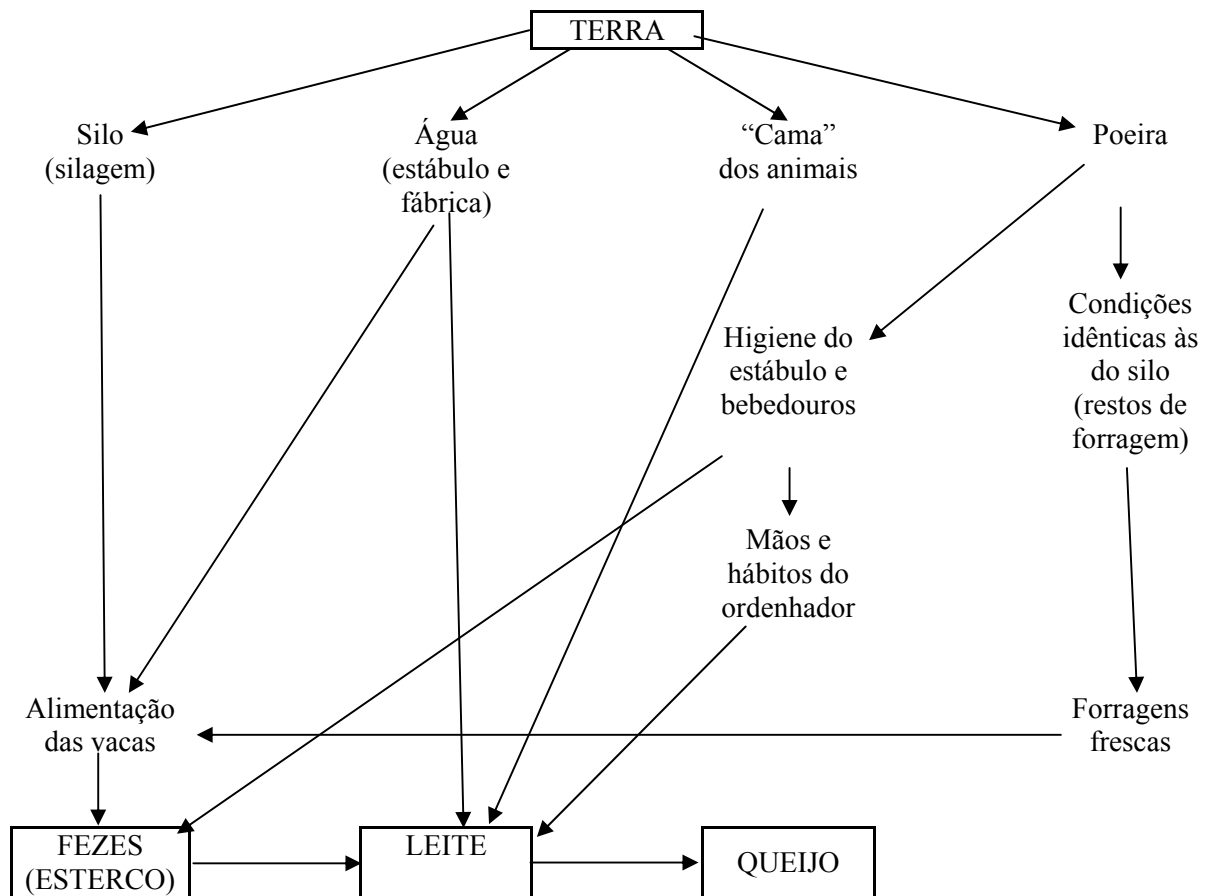


Figura 2. Fontes possíveis de contaminação do leite com esporos de *Clostridium*.

Fonte: Furtado, 1991.

Segundo Wasserfall e Teuber (1979) *C. tyrobutyricum* origina-se principalmente do emprego de silagem na alimentação do gado, e como seus esporos sobrevivem facilmente à temperatura de pasteurização, podem provocar o defeito tufamento tardio. De acordo com Su e Ingham (2000), os esporos geralmente atingem o leite cru por meio da contaminação dos tetos pelo esterco durante a ordenha. No entanto, o microrganismo também foi isolado de solo, produtos lácteos, fezes de cães lebreiros, fezes bovinas e humanas, tanto de adultos quanto de crianças (SNEATH, 1986).

- *Clostridium butyricum*

Bastonete Gram-positivo, anaeróbio estrito, móvel por flagelos peritríquios, que apresenta esporos ovais, centrais a subterminais. A faixa de temperatura de multiplicação ocorre entre 30 e 37°C, mas não a 10°C. A forma esporulada resiste 10 minutos à 80°C (PREVOT, 1966; SNEATH, 1986). A multiplicação é estimulada pela fermentação de carboidratos e inibida por 6,5% de NaCl. Os produtos de fermentação são os ácidos butírico, acético e fórmico, além do ácido láctico e succínico. Butanol e etanol algumas vezes são produzidos. A cultura não é tóxica para camundongos (SNEATH, 1986).

O microrganismo, assim como o *C. tyrobutyricum*, também tem sido detectado em casos de deterioração em queijos com tufamento tardio. Mesquita et al. (2001) afirmaram que *C. butyricum* desenvolve-se muito rapidamente, com correspondente produção intensa de gás e tufamento com forte deformação do queijo.

No estudo realizado por Mesquita et al. (2001), *C. butyricum* foi o microrganismo mais freqüentemente isolado de queijos provolone e parmesão considerados tufados, provenientes dos Estados de Goiás e Minas Gerais. Os autores relatam que esse resultado pode ter ocorrido porque à época, poucas vacas leiteiras dos dois Estados recebiam silagem na alimentação.

C. butyricum tem sido isolado de várias fontes, como solo, água doce e sedimentos marinhos, queijo, rúmen de bezerros sadios, fezes de animais e humanos, incluindo de crianças sadias, serpentes venenosas e, ainda que raramente em cultura pura, espécime clínica de humanos e animais, incluindo sangue, urina, trato respiratório, cavidade pleural, abdome, feridas e abscessos (SNEATH, 1986).

- *Clostridium sporogenes*

Bastonete Gram-positivo, estritamente anaeróbio (PREVOT, 1966), móvel por flagelos peritríquios, mede de 0,3 a 1,4 por 1,3 a 16,0 µm. Os esporos são ovais e

subterminais (SNEATH, 1986) e resistem de 15 minutos a 1 hora à 100°C (PREVOT, 1966). Usualmente, são β -hemolíticos. A faixa de temperatura ótima de multiplicação ocorre entre 30 e 40°C, com intervalo entre 25 e 45°C. A multiplicação ótima ocorre em atmosfera contendo 100% de CO₂. Em 6,5% de NaCl, 20% de bile ou pH 8,5, a multiplicação é variável, dependendo do isolado. Os produtos de metabolismo incluem grandes quantidades de ácidos acético e butírico e pequenas quantidades de ácidos isobutírico e isovalérico, podendo ser produzidos ácidos propiônico, valérico, isocapróico, láctico e succínico. Também são produzidos etanol e abundante H₂ (SNEATH, 1986).

Esse microrganismo foi isolado do solo, em toda parte do mundo, esterco, fezes de homens e animais (PREVOT, 1966), sedimentos marinhos, lago de água doce, carne conservada, produtos lácteos, serpente venenosa, de infecções em animais domésticos e em humanos, incluindo bacteremia, endocardite infecciosa, infecções do sistema nervoso central e pleuropneumonia, lesões penianas, abscessos, feridas de guerra e outras infecções piogênicas (SNEATH, 1986).

Assim como *C. tyrobutyricum* e *C. butyricum*, *C. sporogenes* também tem sido detectado em queijos com tufamento tardio (LE BOURHIS et al., 2005), porém com pouca frequência e sempre associado com as outras espécies de *Clostridium*.

- *Clostridium beijerinckii*

São bastonetes com cantos arredondados, móveis por flagelos peritríquios e medem 0,5 a 1,7 por 1,7 a 8,0 μ m. São Gram-positivos em caldo peptona extrato de levedura glicose (PYG), podendo ser Gram-negativos em outros meios de cultura. Os esporos são ovais, excêntricos a subterminais. Isolados podem ser β -, α - ou não hemolítico. A temperatura ótima de multiplicação é 37°C, mas não multiplicam a 25°C ou 45°C. A multiplicação é estimulada pela fermentação de carboidratos e inibida por 6,5% de NaCl ou 20% de bile. Como produtos de fermentação citam-se os ácidos butírico e acético, moderada quantidade de succínico, láctico e fórmico. Traços de ácido propiônico também podem ser detectados. Alguns isolados produzem quantidades substanciais de n-butanol e outros produzem quantidades moderadas de acetona ou isopropanol (SNEATH, 1986).

O microrganismo foi isolado de solo, feridas infeccionadas, azeitona fermentada, doce deteriorado e de fezes humanas (SNEATH, 1986). Le Bourhis et al. (2005) detectaram a presença de *C. beijerinckii*, além de outras espécies de *Clostridium*, em amostras de queijos com defeitos. Neste estudo, os autores observaram a relação entre a presença do defeito e a quantidade de ácido butírico. Ao contrário de *C. tyrobutyricum*, que produz uma grande

quantidade de ácido butírico, *C. beijerinckii* produz uma quantidade inferior durante a maturação em queijos, levando à formação de olhaduras. Desta forma, Le Bourhis et al. (2007) destacaram que sinais como rachaduras ou trincas em queijos contaminados por *C. beijerinckii* deve-se à sua habilidade para produzir hidrogênio. No entanto, os mesmos autores salientam que este defeito pode ser causado por outra bactéria produtora de gás.

- *Clostridium estertheticum*

Foi isolado pela primeira vez por Dainty, Edwards e Hibbard (1989) de carne bovina refrigerada embalada a vácuo, no Reino Unido. Posteriormente, foi nominado por Collins et al. (1992) devido à sua habilidade em produzir ésteres. Desde então, há relatos de sua presença em carnes comercializadas no Reino Unido (DAINTY; EDWARDS; HIBBARD, 1989), na Nova Zelândia (BRODA et al., 1996) e no Brasil (MESQUITA et al., 2006; RAUECKER et al., 2005, 2006; RAUECKER, 2007).

Broda et al. (2002) detectaram o microrganismo em fezes bovinas e pele do animal. Os autores apontaram a presença do clostrídio nas fezes pela sua presença no trato gastrintestinal do animal. A presença na pele do animal foi relatada como consequência de contaminação fecal durante o transporte e na evisceração (BRODA et al., 2002). Boerema, Broda e Bell (2003) também detectaram esta espécie em ambientes de matadouros-frigoríficos, fezes e pele de bovino e solo de abatedouros da Nova Zelândia que apresentavam incidência de tufamento de produtos cárneos embalados a vácuo.

No Brasil, estudo conduzido por Rauecker (2007) verificou a presença de *C. estertheticum* em ambiente de oito matadouros-frigoríficos de bovinos, fezes de bovinos, superfícies de meias-carcacas e em cortes cárneos refrigerados embalados a vácuo normais e tufados. No entanto, na literatura internacional consultada não há relato da presença deste microrganismo em queijos normais ou tufados e nem em outros produtos lácteos.

Collins et al. (1992) caracterizaram o microrganismo como um bastonete Gram-positivo, móvel e estritamente anaeróbio, podendo ocorrer isoladamente ou em pares. Seus esporos são ovais, subterminais, terminais ou centrais. É um psicrófilico (SPRING et al., 2003), com faixa ótima de temperatura entre 1 e 15°C e pH ótimo ao redor de 6,5, sem multiplicação a 22°C (COLLINS et al., 1992; SPRING et al., 2003). A forma esporulada resiste ao aquecimento a 80°C por 10 minutos (COLLINS et al., 1992). Na fermentação são formados butirato, acetato, lactato, 1-butanol, etanol, hidrogênio e dióxido de carbono (SPRING et al., 2003).

Segundo Spring et al. (2003), há duas subespécies, *C. estertheticum* subsp. *laramiense* e *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (Figura 3). Diferenciam-se essencialmente por o primeiro ser β -hemolítico em ágar sangue de carneiro, apresentar temperatura ótima de multiplicação a 15°C, com limite superior de 21°C e faixa de pH de multiplicação entre 4,5 e 7,5, com ótima em 6,5. A subespécie *estertheticum* não é hemolítico em ágar sangue de carneiro, e se multiplica em uma faixa de temperatura entre 6 e 8°C, com limite superior a 13°C, e numa faixa de pH entre 5,5 e 7,8, com ótima variando de 6,5 a 7,2 (SPRING et al., 2003).

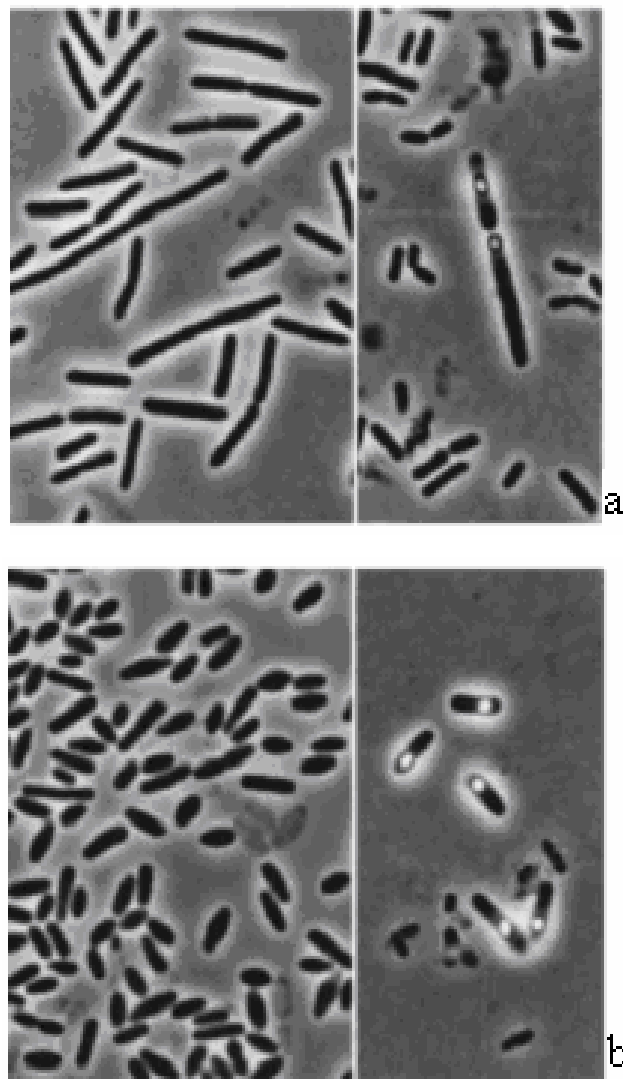


Figura 3. Fotomicrografia de contraste de fase do *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* (a) e *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (b)

Fonte: Spring et al., 2003.

2.3 Detecção de *C. estertheticum* pela reação em cadeia da polimerase

Os métodos convencionais para a identificação e detecção de *Clostridium* em queijo são difíceis e inespecíficos (HERMAN; BLOCK; YAN RENTERGHEM, 1997). A identificação segura se faz por meio de métodos baseados no DNA, como hibridização com sondas de DNA espécie-específica ou da reação em cadeia da polimerase espécie-específica (KLIJN et al., 1995; HERMAN; BLOCK; VAN RENTERGHEM, 1997).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis e colaboradores em 1986. Desde então, tem provocado um grande impacto na biologia molecular, devido à sua enorme sensibilidade e especificidade para amplificar pequena quantidade de DNA ou RNA em milhões de cópias para detecção, seqüenciamento, clonagem e diagnóstico, dentre outros (GU, 1995).

A técnica de PCR foi popularizada pela introdução de termocicladores automáticos e pela descoberta da enzima termoestável *Taq* DNA polimerase (GU, 1995). Essa enzima é proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*, cujo habitat são águas de temperatura alta. Nesse ambiente mantém-se estável mesmo a 94°C, porém sua temperatura ótima é de 72°C (FARAH, 1997; POWLEDGE, 2004).

Um importante aspecto na avaliação de qualquer teste baseado no DNA é a especificidade das seqüências do DNA selecionado do gene e cepa de interesse. A presença do *amplicon* com tamanho esperado é usada como evidência de que o PCR é positivo. Entretanto, a identidade do fragmento amplificado deverá ser confirmada por meio de hibridização por sondas específicas de DNA, digestão com enzima de restrição ou pelo seqüenciamento do fragmento do DNA - alvo (OLSEN et al., 1995).

Alguns cuidados devem ser observados quando se utiliza o PCR para detectar microrganismos em alimentos. A composição do alimento pode inibir a reação; a técnica não distingue células vivas de mortas; partículas do alimento podem interferir na reação, devendo ser removidas antes da adição da mistura de reagentes porque somente 1 a 10 µL da amostras será submetida ao PCR. Alguns procedimentos têm sido usados para remover os interferentes e inibidores, tais como isolamento do DNA e métodos de purificação, cultura de enriquecimento com e sem etapas de isolamento de DNA e técnicas imunomagnéticas (WANG; CAO; CERNIGLIA, 1997).

Helps, Harbour e Corry (1999) e Broda, Boerema e Bell (2003) pesquisaram *Clostridium estertheticum* em amostras de carnes tufadas por meio da técnica de PCR e obtiveram sucesso em seus estudos. Esses autores são unânimes em afirmar que o método é

vantajoso por ser específico e de execução rápida. Entretanto, Herman, Block e van Renterghem (1997) relatam que a detecção de células bacterianas em queijo requer um preparo adequado da amostra a fim de eliminar os componentes inibidores do PCR.

Visando a detecção de *C. estertheticum* por meio da técnica de PCR, quatro pares de *primers* já foram desenhados. Helps, Harbour e Corry (1999) desenharam dois pares, sendo um de baixa especificidade. Para compensar essa inadequação acrescentaram a utilização de enzimas de restrição. Assim, os mesmos autores desenharam outro par de *primers*, denominados de *revised forward* (RF) e *revised reverse* (RR), que anelam nas posições 173-197 e 813-792, respectivamente, da sequência do *C. estertheticum* 16S rDNA (Nº de acesso ao GenBank S46734) e amplificam um produto de PCR de 641pb.

Broda, Boerema e Bell (2003) desenharam mais dois pares de *primers* um específico para *C. estertheticum* DSM 8809^T (T = cepa-tipo), o EISR, e outro que detecta tanto o *C. estertheticum* DSM 8809^T, quanto *C. estertheticum*-like, 16SE. O primeiro par amplifica um produto de PCR de 230pb, enquanto o segundo par anela nas posições 205-222 e 996-977, respectivamente, da sequência do *C. estertheticum* 16S rDNA (Nº de acesso ao GenBank S46734), e obtém um produto de PCR de 790pb. Ambos os pares apresentam um nível mínimo de detecção de 10⁴ células/g para amostras de carne sem enriquecimento e 10² células/g para amostras enriquecidas (BRODA; BOEREMA; BELL, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de *Clostridium estertheticum* em leite cru e em queijos parmesão e provolone por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de ocorrência de *C. estertheticum* em leite cru provenientes de propriedades localizadas em municípios do entorno de Goiânia, Goiás;
- Determinar a frequência de ocorrência de *C. estertheticum* em queijos parmesão e provolone comercializados no mercado varejista de Goiânia, Goiás;
- Avaliar o efeito do uso do pré-enriquecimento não-seletivo e do não-enriquecimento das amostras na detecção de *C. estertheticum* em leite e queijos pela técnica de PCR;
- Avaliar o efeito da incubação em três períodos distintos do pré-enriquecimento não-seletivo para a detecção de *C. estertheticum* em leite e queijos por meio da técnica de PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

No presente trabalho foram analisadas 127 amostras, sendo 95 de queijo e 32 de leite cru. Dentre as amostras de queijo, 29 eram de queijo parmesão, 35 de provolone e 31 de queijo ralado, sendo duas de provolone e 29 de parmesão. O número de amostras foi calculado tendo como base SAMPAIO (1998).

A distribuição das amostras segundo a apresentação do produto encontra-se na Tabela 1. Já a distribuição segundo a fonte, Estado da Federação e estado de conservação, não-deteriorada (normal) ou deteriorada, encontra-se detalhada nos Apêndices A, B, C e D.

Tabela 1. Distribuição de amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone segundo a apresentação do produto. Goiânia - GO, 2007.

FONTE	Nº DE AMOSTRAS
Leite Cru	32
Queijo Parmesão	29
peça inteira	03
fracionado pela indústria	12
fracionado pela rede de distribuição	14
Queijo Provolone	35
peça inteira	13
fracionado pela indústria	14
fracionado pela rede de distribuição	08
Queijo Parmesão Ralado	29
ralado pela indústria	25
ralado pela rede de distribuição	04
Queijo Provolone Ralado	02
ralado pela indústria	01
ralado pela rede de distribuição	01
TOTAL	127

Relativamente às amostras de queijo, 76/95 (80,0%) eram produtos aparentemente normais, aptos ao consumo, enquanto que 19/95 (20,0%) apresentavam sinais de deterioração, com tufamento, olhaduras, excesso de oleosidade e crescimento de bolores. Entre as amostras com sinais de deterioração, 11/19 (57,9%) eram de queijo parmesão, 4/19 (21,0%) de provolone, 1/19 (5,3%) de provolone ralado e 3/19 (15,8%) de parmesão ralado.

Ainda em relação às amostras de queijo, 42/95 (44,2%) foram fabricadas por indústrias localizadas no Estado de Goiás, 22/95 (23,2%) em São Paulo, 19/95 (20,0%) em Minas Gerais, 6/95 (6,3%) em Mato Grosso e 6/95 (6,3%) em outros estados (Tocantins e outros não informados) (Figura 4).

Todas as amostras de leite (32) originaram do Estado de Goiás, sendo oito (25,0%) de Piracanjuba, seis (18,8%) de Hidrolândia, seis (18,8%) de Inhumas, cinco (15,6%) de Aragoiânia, três (9,4%) de Professor Jamil, duas (6,2%) de Caturai, uma (3,1%) de Cromínia e uma (3,1%) de Goiânia (Figura 5).

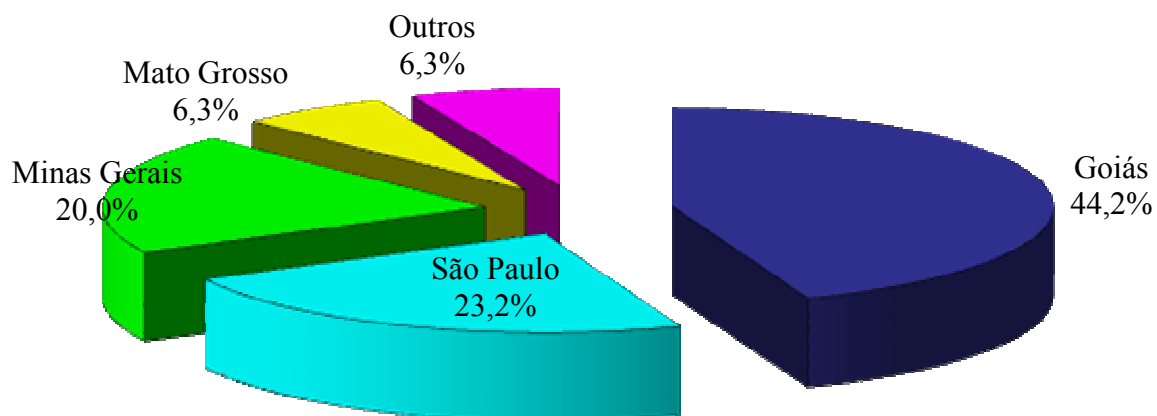


Figura 4. Distribuição das amostras de queijos parmesão e provolone segundo o Estado de localização das indústrias.

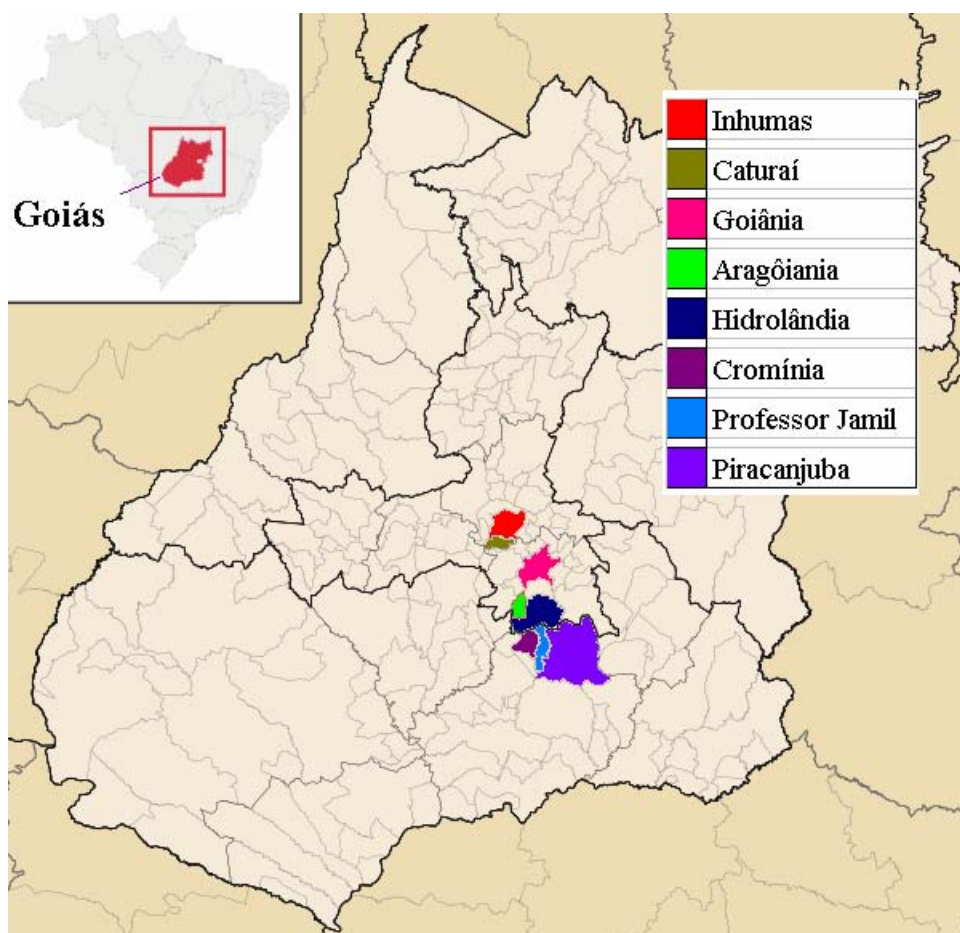


Figura 5. Mapa do Estado de Goiás destacando os Municípios de procedência das amostras de leite cru.

Fonte: DNIT, 2002. Modificado.

4.2 Colheita das amostras

Compuseram a amostragem 36 marcas comerciais de queijos parmesão e provolone. Durante a colheita tomou-se o cuidado de colher o máximo de marcas existentes no mercado. As amostras foram colhidas aleatoriamente, levando em consideração o prazo de validade e a chancela dos Serviços de Inspeção Estadual - SIE, ou Federal - SIF. Tanto as amostras aparentemente não deterioradas, portanto consideradas aptas para o consumo, como aquelas com sinais de deterioração, foram colhidas em 15 estabelecimentos do mercado varejista de Goiânia, na forma como eram comercializadas, ou seja, peça inteira, fracionada ou ralada pela própria indústria ou pela empresa que comercializava o produto no varejo.

Os queijos foram embalados e/ou re-embalados no período compreendido entre fevereiro 2006 a janeiro 2007. A data de fabricação corresponde à data de embalagem dos queijos, após serem submetidos ao período de maturação e a data de re-embalagem ao processo de fracionamento ou ralação do produto no mercado varejista (Apêndices B, C e D).

As amostras de leite foram colhidas em janeiro de 2007, em 29 propriedades produtoras de matéria-prima para laticínios e queijarias do Estado de Goiás. A colheita foi realizada em tanques individuais de refrigeração por expansão direta, armazenados na propriedade por, no máximo, 48 horas, em temperaturas entre 0,8 e 6,3°C (Apêndice A).

A colheita seguiu o procedimento recomendado pela Instrução Normativa nº 51/2002 (BRASIL, 2002). Após homogeneização do leite no tanque por, no mínimo, cinco minutos eram transferidos, com auxílio de uma concha, 50 mL para um frasco de polipropileno esterilizado. À amostra não foi adicionado nenhum conservante para evitar interferência na reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma vez colhidas, as amostras foram identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

Todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA/EV/UFG), onde foram imediatamente analisadas. Após a recepção, foram descaracterizadas por etiqueta adesiva que continha um código de modo a permitir a análise sem a identificação do nome da empresa em questão.

4.3 Detecção Molecular de *C. estertheticum*

4.3.1 Procedimento de preparo das amostras

A retirada da unidade analítica da cada amostra foi precedida pela sanitização com etanol a 70%, por um tempo mínimo de 30 segundos, da superfície de cada embalagem comercial de queijo e dos frascos de polipropileno que continham o leite. Após a sanificação as embalagens foram abertas assepticamente, pesados cinco gramas de queijo e homogeneizados em 25 mL de solução salina 0,85%, pH 7,0 (Mallinckrodt Baker) em Stomacher (Stomacher 400, Seward) por três minutos. O volume de solução salina foi estipulado em função da quantidade necessária para a perfeita homogeneização. Após um período de repouso para decantação, fez-se a filtração, sendo utilizado 4 mL do filtrado para análise.

As amostras de leite foram homogeneizadas em vortex (AP 56, Phoenix) e uma alíquota de 4 mL utilizada para análise. As amostras foram aquecidas a 80°C/10 min em Banho-Maria no intuito de estimular a germinação dos esporos e inativar as células vegetativas.

A amplificação do DNA genômico foi avaliada nas amostras submetidas ou não ao pré-enriquecimento em caldo infusão cérebro coração (BHI, Difco).

A) Amostras sem pré-enriquecimento

Volumes de 2 mL do filtrado ou do leite foram utilizados para a extração do DNA genômico. Após a centrifugação da amostra a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi lavado com solução salina a 0,85% por no mínimo três vezes para remoção da gordura e resíduos. O sedimento foi ressuscitado em 400 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

B) Amostras pré-enriquecidas em caldo BHI

Para o cultivo do microrganismo 2 mL do filtrado ou do leite foram inoculados em 20 mL de caldo BHI pré-reduzido. A incubação foi realizada em jarra de anaerobiose (Gas PackTM, BD) durante cinco, 10 e 30 dias a 10°C. Após cada período de incubação, foram retirados 5 mL da cultura para o processamento das amostras, sendo repostos igual volume de caldo BHI pré-reduzido. O cultivo foi centrifugado e processado conforme procedimento descrito anteriormente.

4.3.2 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada em conformidade com a metodologia proposta por van Soolingen et al. (1991), com as seguintes modificações: às amostras ressuspensas em TE foram adicionados 150 µL de lisozima (10 mg/mL) (Gibco Corporation), homogeneizados em vortex e incubados a 37°C por 24 horas; a lise das células dos microrganismos foi completada com 70 µL de Dodecylsulfato de Sódio 10% (pH 7,2) (SDS, Invitrogen), 100 µL de NaCl 5M (Mallinckrodt Baker) e 80 µL de Brometo de hexadeciltrimetilamônio a 10% (CTAB, ICN Biomedicals), seguido de homogeneização e incubação a 65°C/15min. A purificação do DNA genômico foi realizada com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (JT Baker) e a precipitação com etanol absoluto gelado durante 18h a 18°C. Após centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente o “pellet” de DNA foi lavado com etanol 70% e submetido à secagem à temperatura ambiente por duas horas, conforme van Soolingen et al. (1991). Após este período, foi ressuspensado em 100 µL de tampão TE (pH 8,0).

Para avaliação da qualidade e determinação da concentração, 2 µL de solução de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X, pH 8,0 (Tris-Borato-EDTA) a 80 V/40 min. O λ DNA/*Hind III* (Invitrogen®) foi utilizado como padrão de peso molecular (PM). O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo (5 mg/mL), visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV-25, Hoefer) e fotografado em câmara digital (Doc Print, Vilber Lourmat).

A concentração de DNA foi estimada por comparação visual com diluições conhecidas de λ DNA (Invitrogen®). Uma vez determinada a concentração do DNA em solução, esta foi diluída para 100 ng/5 µL para a reação de PCR e estocada a -20°C.

4.3.3 Protocolos para o PCR

A amplificação foi realizada com pares de *primers* complementares à região conservada da subunidade 16S do DNA ribossômico. Utilizaram-se os pares *revised forward* (RF) e *revised reverse* (RR) (HELPS; HARBOUR; CORRY, 1999) e 16SEF e 16SER (BRODA; BOEREMA; BELL, 2003).

O par RF/RR (HELPS; HARBOUR; CORRY, 1999) apresenta as seqüências 5'-TGA TCG CAT GAT CTT AAC ATC AAA G-3' e 5'-TCG ACC CCC GAC ACC TAG TAT T-3', que se anelam nas posições 173-197 e 813-792, respectivamente, do 16S DNAr da sequência S46734 (GENBANK, 2007) e formam um produto de PCR de 641 pares de base (pb), enquanto que o par 16SEF/16SER (BRODA; BOEREMA; BELL, 2003) possui as

seqüências 5'-TCG GAA TTT CAC TTT GAG-3' e 5'-AAG GAC TTC ACT CAT CTC TG-3', que anelam nas posições 205-222 e 996-977 do 16S DNAr da seqüência S46734 (GENBANK, 2007) e formam um produto de amplificação de 790pb. As concentrações finais dos reagentes que compuseram as soluções de amplificação com cada par de *primers* estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2. Misturas de reação de amplificação de PCR e concentrações finais de reagentes, segundo os pares de *primers* utilizados. Goiânia – GO, 2007.

REAGENTES	PARES DE <i>PRIMERS</i>	
	RF/RR	16SEF/16SER
Referência	Helps, Harbour, Corry (1999)	Broda, Boerema, Bell (2003)
Tampão 1x		
Tris-HCl, pH 8,3	100 mM	100 mM
KCl	500 mM	500 mM
Solução de DNA	100 ng	100 ng
dNTP	0,2 mM	0,2 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
<i>Primer reverse</i>	0,3 mM	0,5 mM
<i>Primer foward</i>	0,3 mM	0,5 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase	2 U	4 U
Volume Total	50 µL	50 µL

Para a amplificação do par RF/RR, a desnaturação inicial foi de 94°C/5 min, seguindo-se 40 ciclos de desnaturação a 94°C/1 min, anelamento a 60°C/1 min e extensão a 72°C/1 min, com extensão final de 72°C/10 min (HELPS; HARBOUR; CORRY, 1999). Para o par 16SEF/16SER, a desnaturação inicial foi a 93°C/3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C/1 min, anelamento a 55°C/1 min e extensão a 72°C/3 min com extensão final a 72°C/3 min (BRODA; BOEREMA; BELL, 2003).

Os fragmentos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, pH 8,0, com corrida a 120 V/40 min. O gel foi corado com brometo de etídeo (5 mg/mL) e os resultados visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV-25, Hoefer). A documentação fotográfica foi realizada com câmara digital (Doc Print, Vilber Lourmat).

Como controle negativo de reagentes foi utilizada a mistura de reação adotada para cada par, com substituição do DNA por água ultra-pura. Como controle positivo foi utilizada

a cepa de referência adquirida junto à coleção alemã de microrganismos e culturas celulares (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, Alemanha), *C. estertheticum* DSM 8809^T. Utilizou-se como padrão de peso molecular (PM) o 100bp DNA *Ladder* (Invitrogen).

4.4 Confirmação da identidade dos produtos de amplificação

Visando a confirmação da identidade dos produtos de amplificação obtidos foram enviadas cinco amostras positivas para *C. estertheticum* com o par de *primers* RF/RR e quatro com o 16SEF/16SER ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UNB) para seqüenciamento.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se kit comercial (QIAquick PCR purification kit, Qiagen), e quantificados por comparação visual da intensidade das bandas com as do *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5X (pH8,0) após coloração com brometo de etídeo (0,6 µg/mL). As amostras foram analisadas em seqüenciador automático (Megabace 1000, Amersham Biotech®). As seqüências obtidas foram analisadas em ferramentas de bioinformática Phred, Phrap e CAP3 e comparadas com as seqüências de referência registradas no BLAST, cujos números de acesso são S46734 e X68181 (GENBANK, 2007).

4.5 Análise estatística

A análise dos dados referentes à detecção e distribuição do *C. estertheticum* foi realizada com base na análise descritiva com distribuição de frequência conforme Sampaio (1998).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Detecção de *C. estertheticum* em leite cru e em queijos

A Tabela 3 apresenta a distribuição de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone, normais ou com sinais de deterioração, detectado por meio da técnica de PCR.

Do total de amostras analisadas, 28/127 (22,0%) foram positivas para o *C. estertheticum* e 99/127 (78,0%) negativas, independente do procedimento de preparo das amostras (extração do DNA genômico sem e com pré-enriquecimento) e do par de *primers* utilizado para a amplificação. Em leite cru, 11/32 (34,4%) foram positivas e 21/32 (65,5%) negativas, enquanto que em queijos parmesão e provolone, independente da forma de apresentação, 17/95 (17,9%) foram positivas e 78/95 (82,1%) negativas (Tabela 3).

Em relação às amostras de queijos considerados normais, portanto aptas para o consumo, 13/76 (17,1%) foram positivas para o *C. estertheticum* e 63/76 (82,9%) negativas. Naquelas com sinais de deterioração, 04/19 (21,0%) foram positivas e 15/19 (78,9%) negativas para o *C. estertheticum* (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de *C. estertheticum* em amostras de leite cru, queijos normais e queijos com sinais de deterioração, segundo as fontes de detecção. Goiânia-GO, 2007.

FONTES	<i>C. estertheticum</i>			
	(+)		(-)	
	Nº	%	Nº	%
Leite cru	11/32	34,4	21/32	65,6
Queijos Parmesão e Provolone (Inteiros, Peças, Fatiados ou Ralados)	17/95	17,9	78/95	82,1
Queijos normais	13/76	17,1	63/76	82,9
Queijos com sinais de deterioração	04/19	21,0	15/19	78,9
Total	28/127	22,0	99/127	78,0

(+) resultado positivo ao PCR. (-) resultado negativo ao PCR. Nº: resultado obtido/amostras analisadas.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 3 nota-se que o *C. estertheticum* foi detectado em todas as fontes pesquisadas, em índices que variam de 17,1% a 34,4%, sendo a maior ocorrência em leite cru. A elevada ocorrência em amostras de leite cru pode ser explicada, em parte, pela presença dos esporos de *C. estertheticum* no solo, no trato gastrointestinal, em fezes bovinas (BRODA et al., 2002; RAUECKER, 2007), associada à higienização inadequada dos estábulos e equipamentos, ordenhadeira e/ou tetos antes da ordenha.

Considerando a forma de apresentação das amostras de queijo analisadas verifica-se que o *C. estertheticum* foi detectado em amostras inteiras, fracionadas e raladas, além dos queijos aparentemente normais e com sinais de deterioração (Tabela 3). A presença de *C. estertheticum* em todos os tipos de amostras de queijo analisadas pode estar associada às várias fontes potenciais de contaminação por esse microrganismo. Devido à ocorrência do microrganismo em amostras de leite cru, a matéria-prima torna-se uma importante fonte de contaminação, apesar do tratamento térmico a que o leite e a massa de alguns queijos são submetidos. Dados da literatura confirmam a resistência térmica dos esporos de *C. estertheticum* a 80°C/10 min (COLLINS et al., 1992). A contaminação da planta industrial constitui uma fonte em potencial conforme relatado por Broda et al. (2002) e Rauecker (2007) em ambientes de matadouros-frigoríficos, que também podem ter relação com o manipulador. Além disso, a condição de anaerobiose que é criada no interior do produto e a temperatura de maturação a que são submetidos, inferior a 18°C (SPREER, 1991; BERESFORD et al., 2001) são favoráveis à germinação do esporo de *C. estertheticum*.

Até o momento, não havia relato da ocorrência de *C. estertheticum* em produtos lácteos no Brasil. No entanto, alguns estudos já comprovaram sua presença em carnes refrigeradas embaladas a vácuo estando associado ao tufamento das embalagens e deterioração da carne, e a disseminação no ambiente de matadouros-frigoríficos e em fezes bovinas no Reino Unido (DAINTY; EDWARDS; HIBBARD, 1989), Nova Zelândia (BRODA et al., 1996) e no Brasil (MESQUITA et al., 2006, RAUECKER et al., 2006, RAUECKER, 2007).

Na Tabela 4 pode ser observada a distribuição de *C. estertheticum* em amostras de queijos normais e com sinais de deterioração, segundo o tipo de queijo. Em relação ao tipo de queijo analisado, 4/29 (13,8%) amostras de parmesão, 3/35 (8,6%) de provolone e 10/31 (32,3%) de parmesão e provolone ralados foram positivas, enquanto que 25/29 (86,2%) de queijo parmesão, 32/35 (91,4%) de provolone e 21/31 (67,7%) de parmesão e provolone ralados foram negativas.

Tabela 4. Distribuição de *C. estertheticum* em amostras de queijos normais e com sinais de deterioração, segundo o tipo de queijo. Goiânia-GO, 2007.

FONTES	<i>C. estertheticum</i>			
	(+)		(-)	
	Nº	%	Nº	%
Queijo Parmesão	04/29	13,8	25/29	86,2
Normal	03/18	16,7	15/18	83,3
Com sinais de deterioração	01/11	9,1	10/11	90,9
Queijo Provolone	03/35	8,6	32/35	91,4
Normal	02/31	6,4	29/31	93,6
Com sinais de deterioração	01/04	25,0	03/04	75,0
Queijos Parmesão e Provolone Ralados	10/31	32,3	21/31	67,7
Normal	08/27	29,6	19/27	70,4
Com sinais de deterioração	02/04	50,0	02/04	50,0
TOTAL	17/95	17,9	78/95	82,1

(+) resultado positivo ao PCR. (-) resultado negativo ao PCR. Nº: resultado obtido/amostras analisadas.

Quando se considerou o estado de conservação, o queijo parmesão normal apresentou 3/18 (16,7%) amostras positivas, enquanto que no com sinal de deterioração observou-se apenas 1/11 (9,1%) positiva. Por outro lado, em queijo provolone normal foram observadas 2/31 (6,4%) amostras positivas e no com sinal de deterioração apenas 1/4 (25,0%) positiva. Em queijos parmesão e provolone ralados normais foram verificadas 8/27 (29,6%) amostras positivas e nos dois tipos de queijos ralados com sinais de deterioração 2/4 (50,0%) positivas (Tabela 4).

A maior frequência de ocorrência foi observada em queijos parmesão e provolone ralados (32,3%). Apesar dos queijos ralados serem comercializados em embalagens permeáveis ao oxigênio, o microrganismo pôde ser encontrado, pois sua forma esporulada pode sobreviver em condições de aerobiose e anaerobiose facultativa. Além disso, o alto percentual verificado pode ser atribuído, em parte, por um controle higiênico inadequado na indústria ou rede de distribuição, conforme mencionado anteriormente. A condição de origem do queijo destinado a ralação pode justificar sua contaminação, ou seja, algumas indústrias ou estabelecimentos varejistas quando detectam algum sinal de deterioração no produto final ou ao longo da maturação destina-os à ralação. Os queijos ainda podem ser contaminados pelo

manipulador, pois o processo de ralação exige manipulação do produto, o que aumenta a probabilidade de contaminação pelo manipulador, equipamentos de ralação e contaminação cruzada entre queijos.

Relativamente ao estado de conservação (Tabela 4), o microrganismo está presente nos queijos normais e nos queijos com sinais de deterioração, mas a maior frequência foi observada nos queijos ralados com sinais de deterioração (50,0%) e nos normais (29,6%). O queijo provolone com sinal de deterioração apresentou positividade de 25,0%. Queijos ralados, tanto com sinais de deterioração quanto normais apresentaram maior positividade, provavelmente pelos mesmos motivos citados anteriormente. Isto reforça a constatação de que o processo de ralação eleva a contaminação devido a maior manipulação do produto e contato com uma variedade de superfícies e equipamentos.

A elevada positividade de *C. estertheticum* nas amostras de provolone com sinal de deterioração pode ser explicada, em parte, pelo seu processamento tecnológico, pois os tratamentos térmicos a que são submetidos o leite (pasteurização) e a massa (filagem), são insuficientes para eliminarem os esporos, além de eliminarem grande parte da microbiota competidora para o *C. estertheticum*. O fato do período de maturação do queijo provolone ser inferior ao do parmesão e à condição de que as indústrias estão reduzindo ao máximo o período de maturação dos queijos podem contribuir para que o mesmo seja encontrado com sinais de deterioração no mercado varejista, pois o curto tempo de maturação pode ser insuficiente para germinação dos esporos ainda na indústria.

5.2 Detecção de *C. estertheticum* segundo os pares de *primers* e as fontes

Na Tabela 5 estão distribuídos os dados relativos à detecção de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone, segundo os pares de *primers* utilizados no PCR. A Figura 6 refere-se a uma eletroforese em gel de agarose a 1,0% de produtos de amplificação detectados com os pares de *primers* RF/RR e 16SEF/16SER do gene 16S *rDNA* do *C. estertheticum* detectado em amostras de leite cru e queijo parmesão e provolone.

Das amostras positivas de leite cru detectadas neste trabalho, 20/127 (15,7%) foram positivas e 107/127 (84,3%) negativas quando se utilizou o par de *primers* RF/RR, enquanto 10/127 (7,9%) foram positivas ao par 16SEF/16SER e 117/127 (92,1%) negativas (Tabela 5).

Ambos os pares de *primers* utilizados permitiram detectar *C. estertheticum*, embora a maior eficiência tenha sido apresentada pelo par RF/RR em todas as fontes analisadas.

Com relação às fontes analisadas o leite cru apresentou 7/32 (21,9%) amostras positivas com o par RF/RR e 5/32 (15,6%) com 16SEF/16SER e, os queijos, 13/95 (13,7%) positivas com o par RF/RR e 5/95 (5,3%) com 16SEF/16SER. Nas amostras de queijo parmesão foram detectados 4/29 (13,8%) resultados positivos, sendo 3/29 (10,3%) com o par RF/RR e 1/29 (3,4%) com o 16SEF/16SER. Já nas amostras de provolone, 3/35 (8,6%) resultados foram positivos, sendo duas com o par RF/RR e uma com 16SEF/16SER. Já nos queijos parmesão e provolone ralados, das dez amostras positivas neste trabalho, 8/31 (25,8%) foram identificadas com a amplificação com o par RF/RR e 3/31 (9,7%) com 16SEF/16SER.

Estes resultados evidenciam uma baixa eficiência do par 16SEF/16SER comparativamente ao outro par de *primers* utilizado para detecção de *C. estertheticum* nas fontes estudadas. De forma semelhante, Rauecker (2007) também obteve menor número de amostras positivas ao utilizar o 16SEF/16SER para detecção de *C. estertheticum* em carne bovina refrigerada embalada a vácuo, além de amostras de ambiente, equipamentos de matadouros-frigoríficos e fezes bovinas.

Tabela 5. Detecção de *C. estertheticum* em leite cru e em queijos parmesão e provolone, segundo os pares de *primers* utilizados para amplificação. Goiânia-GO, 2007.

FONTES	Par RF/RR				Par 16SEF/16SER			
	(+)		(-)		(+)		(-)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Leite Cru	07/32	21,9	25/32	78,1	05/32	15,6	27/32	84,4
Queijos	13/95	13,7	82/95	86,3	05/95	5,3	90/95	94,7
Parmesão	03/29	10,3	26/29	89,7	01/29	3,4	28/29	96,6
Provolone	02/35	5,7	33/35	94,3	01/35	2,9	34/35	97,1
Parmesão e Provolone Ralado	08/31	25,8	23/31	74,2	03/31	9,7	28/31	90,3
TOTAL	20/127	15,7	107/127	84,3	10/127	7,9	117/127	92,1

(+) resultado positivo ao PCR. (-) resultado negativo ao PCR. Nº: resultado obtido/amostras analisadas.

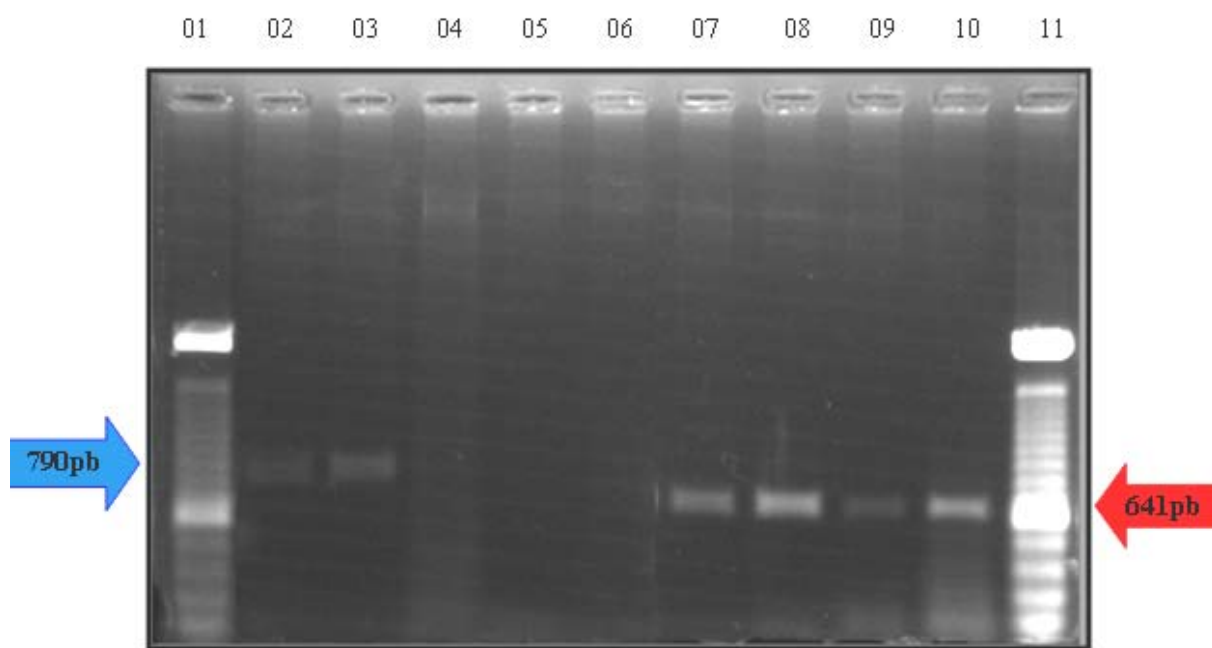


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,0% de produtos de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone, com os pares de *primers* RF/RR (641pb) e 16SEF/16SER (790pb). Canaletas 01 e 11 padrão de peso molecular (100bp DNA *Ladder*); 02 e 10 controles positivos (DSM 8809); 03 amostra positiva para o par 16SEF/16SER; 04 e 05 controle negativo para o par 16SEF/16SER; 06 controle negativo para o par RF/RR; 07 a 09 amostras positivas para o par RF/RR.

Nas Figuras 7 e 8 estão apresentadas as distribuições de *C. estertheticum* segundo o uso individual, simultâneo e independente dos pares de *primers* empregados na reação de PCR, no total de amostras analisadas e em cada fonte analisada, respectivamente. Com o par RF/RR foram detectadas 20/127 (15,7%) das amostras positivas enquanto que com o par 16SEF/16SER, 10/127 (7,9%). Apenas 2/127 (1,6%) amostras apresentaram resultados positivos com o uso simultâneo dos dois pares de *primers*, porém quando os mesmos pares foram empregados de forma independente foram detectadas 28/127 (22,0%) amostras positivas (Figura 7).

Essa diferença de detecção dos pares de *primers* utilizados na detecção de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone pode ser explicada, em parte, pela diferença de sensibilidade dos pares de *primers*, onde o par RF/RR mostrou-se mais sensível à concentração e degradação do DNA extraído para amplificação, o que também foi verificado por Rauecker (2007). Desta forma, justifica-se a associação de pares de *primers* na detecção do microrganismo por PCR.

Considerando as fontes analisadas, apenas 1/32 (3,1%) amostra de leite cru e 1/31 (3,2%) de queijo parmesão e provolone ralados foram positivas simultaneamente com os dois pares. Porém ao associá-los, mas mantendo a independência entre eles, proporcionaram os seguintes resultados positivos 11/32 (34,4%) para leite cru, 4/29 (13,8%) para queijo parmesão, 3/35 (8,6%) para queijo provolone e, 10/31 (32,3%) para queijos parmesão e provolone ralados (Figura 8).

Quando se considera os resultados obtidos com o uso individual de cada par de *primers*, verifica-se a maior positividade para o par RF/RR, como discutido anteriormente. No entanto, ao analisar os resultados obtidos com o uso simultâneo dos dois pares, não se observa o efeito desejado de aumentar o número de amostras positivas. Isto provavelmente se deve à sensibilidade de cada par de *primers* utilizados e provável diferentes genogrupos nas amostras.

A totalidade de amostras positivas detectadas neste trabalho foi obtida apenas com a amplificação com ambos os pares de *primers*. Os resultados aqui descritos revelam a necessidade de se realizar a amplificação de amostras para detecção de *C. estertheticum* com mais de um par de *primers* para aumentar a sensibilidade da técnica, conforme já verificado por Rauecker (2007). Desta forma, considerando os resultados obtidos sugere-se a associação entre pares de *primers* com o intuito de reduzir o número de resultados falso-negativos, permitindo a identificação da totalidade de amostras positivas, melhorando a sensibilidade do método de detecção.

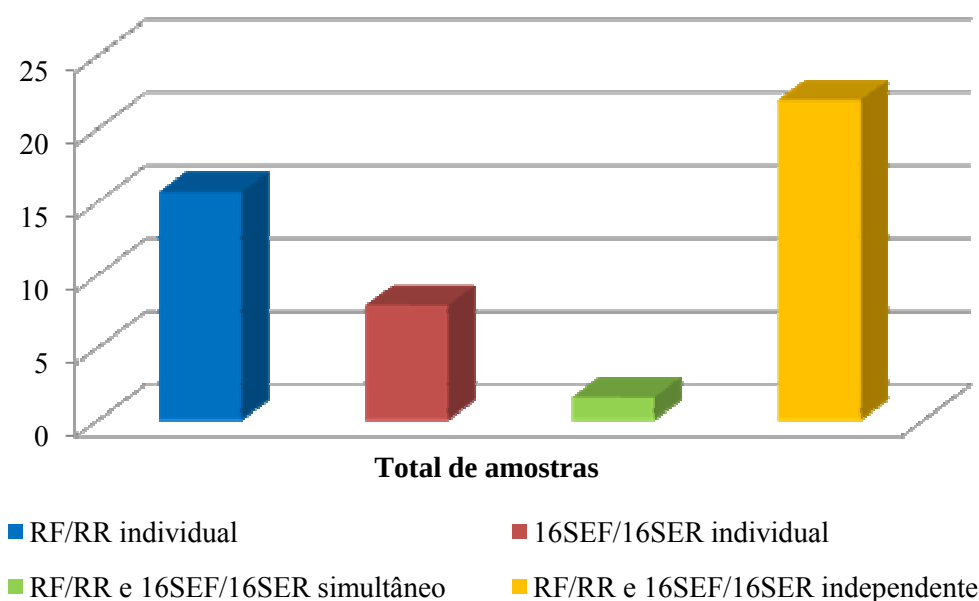


Figura 7. Distribuição de *C. estertheticum* no total de amostras analisadas, segundo o uso individual, simultâneo e independente dos pares de *primers* RF/RR e 16SEF/16SER.

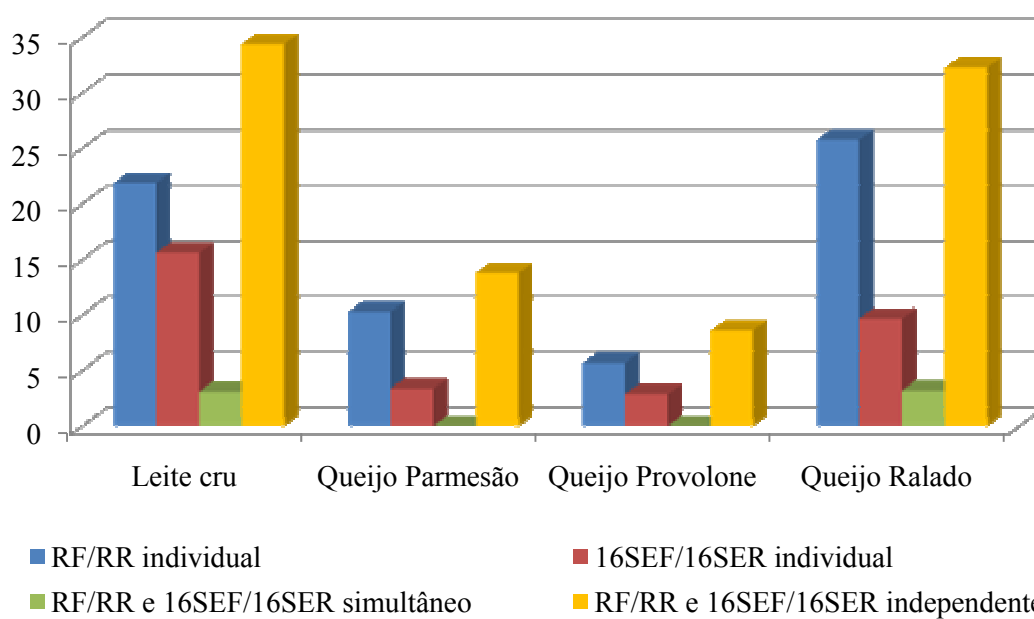


Figura 8. Distribuição de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone, segundo o uso individual, simultâneo e independente dos pares de *primers* RF/RR e 16SEF/16SER.

5.3 Avaliação do efeito do pré-enriquecimento não seletivo na detecção de *C. estertheticum* pela técnica de PCR

Na Tabela 6 estão distribuídos os dados relativos à detecção de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone pré-enriquecidas e sem enriquecimento. No Quadro 1 estão relacionadas as amostras positivas para *C. estertheticum*, segundo a fonte, aspecto do produto, pares de *primers* utilizados e períodos de pré-enriquecimento.

De 28/127 (22,0%) amostras positivas (Tabela 3), 5/127 (3,9%) foram detectadas quando a extração do DNA genômico foi realizada sem pré-enriquecimento e 26/127 (20,5%) quando o pré-enriquecimento não seletivo foi empregado no processo de extração (Tabela 6). Quando se considera a totalidade das amostras analisadas e as diferentes fontes analisadas, verifica-se que a maior positividade foi obtida nas amostras submetidas ao pré-enriquecimento. Para amostras de leite cru, 2/32 (6,3%) foram positivas sem pré-enriquecimento e 9/32 (28,1%) quando pré-enriquecidas. Em queijos, 3/95 (3,2%) foram positivas sem pré-enriquecimento e 17/95 (17,9%) quando pré-enriquecidas.

Considerando somente as amostras de queijos, o parmesão só apresentou resultado positivo quando submetido ao pré-enriquecimento, 4/29 (13,8%), enquanto que o provolone apresentou 2/35 (5,7%) amostras positivas sem pré-enriquecimento e 3/35 (8,6%) quando pré-enriquecidas. Nos queijos parmesão e provolone ralados, 1/31 (3,2%) amostra foi positiva sem pré-enriquecimento e 10/31 (32,3%) quando pré-enriquecidas.

O pré-enriquecimento não seletivo em caldo BHI, sob anaerobiose, elevou o percentual de positividade das amostras. Das amostras positivas apenas três foram positivas quando submetidas à extração do DNA genômico com e sem pré-enriquecimento, PR22, PR26 e RA09, e apenas duas amostras foram positivas sem pré-enriquecimento, LC11 e LC25 (Quadro 01).

O PCR realizado com DNA extraído de amostras pré-enriquecidas detecta, além de células injuriadas e mortas, maior porcentagem de células vivas (HILL, 1996), fato que justifica a maior positividade em amostras pré-enriquecidas, pois permite a revigoração das células injuriadas. Além disso, devido ao tratamento térmico de 80°C por 10 minutos, os esporos são estimulados a germinarem, o que explica, em parte, a maior porcentagem de amostras positivas quando pré-enriquecidas. Vale ressaltar que no pré-enriquecimento o microrganismo se multiplica, eliminando resultados falso-negativos, devido ao aumento do número de células viáveis. Desta forma, o pré-enriquecimento foi importante para a detecção de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone.

Tabela 6. Detecção de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone pré-enriquecidas e não enriquecidas. Goiânia-GO, 2007.

FONTES	Sem pré-enriquecimento				Pré-enriquecidas			
	(+)		(-)		(+)		(-)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Leite Cru	02/32	6,3	30/32	93,7	09/32	28,1	23/32	71,9
Queijos	03/95	3,2	92/95	96,8	17/95	17,9	78/95	82,1
Parmesão	00/29	0,0	29/29	100,0	04/29	13,8	25/29	86,2
Provolone	02/35	5,7	33/35	94,3	03/35	8,6	32/35	91,4
Parmesão e Provolone Ralado	01/31	3,2	30/31	96,8	10/31	32,3	21/31	67,7
TOTAL	05/127	3,9	122/127	96,1	26/127	20,5	101/127	79,5

(+) resultado positivo ao PCR. (-) resultado negativo ao PCR. Nº: resultado obtido/amostras analisadas.

Quadro 1. Relação das amostras positivas para *C. estertheticum*, segundo a fonte, aspecto do produto, pares de *primers* utilizados na amplificação e período de pré-enriquecimento.

Amostra	Aspecto do produto	C. estertheticum							
		RF/RR				16SEF/16SER			
		Pré-enriquecimento				Pré-enriquecimento			
		Sem	5 dias	10 dias	30 dias	Sem	5 dias	10 dias	30 dias
Leite Cru									
LC04	N	-	-	+	-	-	-	-	+
LC05	N	-	-	+	-	-	-	-	-
LC10	N	-	-	-	-	-	-	-	+
LC11	N	-	-	-	-	+	-	-	-
LC12	N	-	-	-	-	-	+	+	+
LC21	N	-	-	-	+	-	-	-	-
LC22	N	-	-	+	+	-	-	-	-
LC25	N	-	-	-	-	+	-	-	-
LC27	N	-	+	-	-	-	-	-	-
LC29	N	-	+	+	+	-	-	-	-
LC30	N	-	+	-	-	-	-	-	-
Queijo Parmesão									
PA03	N	-	-	-	-	-	-	+	+
PA11	N	-	-	+	-	-	-	-	-
PA17	N	-	-	+	-	-	-	-	-
PA18	D	-	+	+	+	-	-	-	-
Queijo Provolone									
PR21	N	-	-	+	-	-	-	-	-
PR22	D	+	+	+	+	-	-	-	-
PR26	N	-	-	-	-	+	+	-	-
Queijo Parmesão (RA) e Provolone (RO) Ralado									
RA04	N	-	-	-	+	-	-	-	-
RA06	N	-	-	+	-	-	-	-	-
RA09	N	+	-	-	-	-	-	-	+
RO15	D	-	-	-	+	-	-	-	-
RA20	N	-	-	+	+	-	-	-	-
RA23	N	-	+	+	+	-	-	-	-
RA24	N	-	-	-	-	-	+	-	-
RA25	N	-	-	+	+	-	-	-	-
RA30	D	-	-	-	-	-	-	+	-
RA31	N	-	-	+	+	-	-	-	-
TOTAL		2	6	14	11	3	3	3	5

N: normal. D: com sinais de deterioração

5.4 Avaliação dos períodos de incubação na detecção de *C. estertheticum* por meio da técnica de PCR

A frequência de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone submetidas ao pré-enriquecimento em caldo não seletivo, segundo os períodos de incubação está apresentada na Tabela 7.

Aos cinco dias, 9/127 (7,1%) amostras foram positivas para *C. estertheticum*, enquanto que aos 10 e 30 dias, 17/127 (13,4%) e 16/127 (12,6%), respectivamente (Tabela 7). Considerando o total de amostras analisadas, pode-se afirmar que as pré-enriquecidas por 10 dias e 30 dias apresentaram o maior percentual de positividade.

Para as amostras de leite cru a frequência de positividade pouco variou em função dos períodos de incubação, ou seja, 4/32 (12,5%) foram positivas aos cinco dias de incubação, 5/32 (15,6%) aos 10 dias e 6/32 (18,7%) aos 30 dias (Tabela 7). Destas amostras, duas (LC12 e LC29) foram positivas em todos os períodos de incubação analisados e uma (LC22) aos 10 e 30 dias de incubação (Quadro 1).

Para as amostras de queijo parmesão e provolone a frequência de positividade observada foi de 5/95 (5,3%) aos cinco dias de incubação, 12/95 (12,6%) aos 10 dias e 10/95 (10,5%) aos 30 dias (Tabela 7). Aos cinco dias, 1/29 (3,4%) amostra foi positiva para o queijo parmesão, 2/35 (5,7%) para o provolone e 2/31 (6,5%) para os queijos parmesão e provolone ralados. Aos 10 dias, 4/29 (13,8%) foram positivas para o queijo parmesão, 2/35 (5,7%) para o provolone e 6/31 (19,4%) para os queijos parmesão e provolone ralados. Aos 30 dias, 2/29 (6,9%) foram positivas para o queijo parmesão, 1/35 (2,9%) para o provolone e 7/31 (22,6%) para os queijos parmesão e provolone ralados (Tabela 7). Das amostras de queijos, três (PA18, PR22 e RA23) foram positivas em todos os períodos de incubação analisados e quatro (PA03, RA20, RA25 e RA31) aos 10 e 30 dias de incubação (Quadro 1).

Ao analisar os resultados verifica-se que a detecção de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone requer períodos de incubação maiores que cinco dias, sendo aconselhável, períodos entre 10 e 30 dias. No entanto, não se sabe a sensibilidade da técnica de PCR na detecção do *C. estertheticum* nos tipos de amostras analisadas, pois em períodos superiores a 30 dias de incubação pode ocorrer degradação do DNA genômico e interferir na reação podendo levar a um resultado falso-negativo.

Tabela 7. Detecção de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone submetidas ao pré-enriquecimento em caldo não seletivo, segundo os períodos de incubação. Goiânia-GO, 2007.

FONTES	5 dias				10 dias				30 dias			
	(+)		(-)		(+)		(-)		(+)		(-)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Leite Cru	04/32	12,5	28/32	87,5	05/32	15,6	27/32	84,4	06/32	18,7	26/32	81,3
Queijos	05/95	5,3	90/95	94,7	12/95	12,6	83/95	87,4	10/95	10,5	85/95	89,5
Parmesão	01/29	3,4	28/29	96,6	04/29	13,8	25/29	86,2	02/29	6,9	27/29	93,1
Provolone	02/35	5,7	33/35	94,3	02/35	5,7	33/35	94,3	01/35	2,9	34/35	97,1
Parmesão e Provolone Ralado	02/31	6,5	29/31	93,5	06/31	19,4	25/31	80,6	07/31	22,6	24/31	77,4
TOTAL	09/127	7,1	118/127	92,9	17/127	13,4	110/127	86,6	16/127	12,6	111/127	87,4

(+) resultado positivo ao PCR. (-) resultado negativo ao PCR. Nº: resultado obtido/amostras analisadas.

A frequência de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone submetidas ou não ao pré-enriquecimento em caldo não seletivo, segundo os períodos de incubação e os pares de *primers* utilizados na amplificação do DNA genômico pode ser vista na Tabela 8.

O par de *primers* RF/RR detectou 2/127 (1,6%) amostras positivas quando não submetidas ao pré-enriquecimento não seletivo, 6/127 (4,7%) quando pré enriquecidas durante cinco dias de incubação, 14/127 (11,1%) durante 10 dias e 11/127 (8,7%) durante 30 dias. Já o par 16SEF/16SER detectou 3/127 (2,4%) amostras positivas não pré-enriquecidas e pré-enriquecidas durante cinco e 10 dias, e 5/127 (3,9%) pré-enriquecidas durante 30 dias.

Em relação às amostras de leite cru, o par de *primers* RF/RR não detectou nenhuma positiva quando a extração foi realizada sem pré-enriquecimento. Mas, foi capaz de detectar 3/32 (9,4%) amostras positivas durante cinco dias de incubação, 4/32 (12,5%) durante 10 dias e 3/32 (9,4%) durante 30 dias (Tabela 8). Destas, uma amostra (LC29) foi positiva em todos os períodos de incubação analisados, e uma (LC22) durante 10 e 30 dias de incubação (Quadro 1).

Quando se analisou a eficiência do par RF/RR, em queijos, 2/95 (2,1%) amostras foram positivas sem pré-enriquecimento, 3/95 (3,2%) durante cinco dias de incubação, 10/95 (10,5%) durante 10 dias e 8/95 (8,4%) durante 30 dias (Tabela 8). Destas amostras, uma (PR22) apresentou resultado positivo quando submetida à extração de DNA genômico sem e com pré-enriquecimento em todos os períodos de incubação analisados. Duas amostras (PA18 e RA23) foram positivas em todos os períodos de incubação analisados e três (RA20, RA25 e RA31) durante 10 e 30 dias de incubação (Quadro 1).

O par RF/RR apresentou maior porcentagem de amostras positivas com pré-enriquecimento durante 10 dias, sendo que três amostras (LC21, RA04 e RO15) foram positivas apenas quando submetidas a 30 dias de incubação. Desta forma, recomenda-se a utilização do par de *primers* RF/RR em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone associada ao pré-enriquecimento das mesmas por um período de 10 dias.

Quando o par 16SEF/16SER foi considerado, as amostras sem pré-enriquecimento apresentaram os seguintes resultados positivos 2/32 (6,3%) em leite cru e 1/95 (1,1%) em queijos. Aos cinco e 10 dias de incubação, 1/32 (3,1%) em leite cru e 2/95 (2,1%) em queijos foram positivas, enquanto que 3/32 (9,4%) em leite cru e 2/95 (2,1%) em queijos foram positivas aos 30 dias de incubação (Tabela 8). Destas amostras, uma (PR26) apresentou resultados positivos quando submetida à extração de DNA genômico sem e com pré-

enriquecimento aos cinco dias de incubação, uma (LC12) em todos os períodos de incubação analisados e uma (PA03) aos 10 e 30 dias de incubação (Quadro 1).

Os resultados obtidos com o par 16SEF/16SER não permitiram eleger um período ótimo de enriquecimento para detecção de *C. estertheticum* nas amostras analisadas. No entanto, notou-se que esse par apresenta menor sensibilidade na detecção do microrganismo em detrimento da quantidade de microrganismo presente ou do grau de degradação do DNA extraído. Desta forma, recomenda-se que ao empregar este par em amostras de leite cru e queijos parmesão e provolone, seja utilizado um período de incubação de 30 dias ou mais na detecção do *C. estertheticum*.

Tabela 8. Frequência de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone, sem e com pré-enriquecimento, segundo os pares de *primers* utilizados na amplificação e os períodos de incubação. Goiânia-GO, 2007.

FONTES	Par RF/RR								Par 16SEF/16SER							
	Pré-enriquecimento								Pré-enriquecimento							
	Sem		5 dias		10 dias		30 dias		Sem		5 dias		10 dias		30 dias	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Leite Cru	00/32	0,0	03/32	9,4	04/32	12,5	03/32	9,4	02/32	6,3	01/32	3,1	01/32	3,2	03/32	9,4
Queijos	02/95	2,1	03/95	3,2	10/95	10,5	08/95	8,4	01/95	1,1	02/95	2,1	02/95	2,1	02/95	2,1
Parmesão	00/29	0,0	01/29	3,4	03/29	10,4	01/29	3,4	00/29	0,0	00/29	0,0	01/29	3,4	01/29	3,4
Provolone	01/35	2,9	01/35	2,9	02/35	5,7	01/35	2,9	01/35	2,9	01/35	2,9	00/35	0,0	00/35	0,0
Parmesão e Provolone Ralado	01/31	3,2	01/31	3,2	05/31	16,1	06/31	19,4	00/31	0,0	01/31	3,2	01/31	3,2	01/31	3,2
TOTAL	02/127	1,6	06/127	4,7	14/127	11,1	11/127	8,7	03/127	2,4	03/127	2,4	03/127	2,4	05/127	3,9

(+) resultado positivo ao PCR. (-) resultado negativo ao PCR. Nº: resultado obtido/amostras analisadas.

5.5 Distribuição de *C. estertheticum* segundo os estabelecimentos de procedência e a origem geográfica das amostras

Na Tabela 9 encontra-se a distribuição de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone segundo os Estados de procedência. Do total de 127 amostras analisadas, 16/74 (21,6%) amostras positivas foram detectadas em Goiás, 3/19 (15,8%) em Minas Gerais, 7/22 (31,8%) em São Paulo, 1/6 (16,7%) em Mato Grosso, 0/1 (0,0%) em Tocantins e 1/5 (20,0%) em Estado não identificado.

No Estado de Goiás, 2/11 (18,2%) amostras positivas para *C. estertheticum* foram detectadas em queijo parmesão, 1/20 (5,0%) em provolone, 2/11 (18,2%) em queijos parmesão e provolone ralados e 11/32 (34,4%) em leite cru. Em relação ao Estado de Minas Gerais, nenhuma amostra de queijo parmesão apresentou resultado positivo, mas 1/8 (12,5%) de queijo provolone e 2/4 (50,0%) de parmesão e provolone ralados foram positivas. Para São Paulo, 1/5 (20,0%) amostra de queijo parmesão e de provolone e 5/12 (41,7%) desses queijos ralados foram positivas. Para o Estado de Mato Grosso e as amostras não identificadas apenas 1/2 (50,0%) amostra de queijo parmesão e provolone ralado e 1/3 de parmesão foram positivas, respectivamente.

Apesar da detecção de *C. estertheticum* em amostras provenientes dos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso serem importantes para avaliar a disseminação do microrganismo no país, estes resultados não são suficientes para classificar os Estados de acordo com os percentuais observados, devido ao baixo número de amostra dos Estados de Mato Grosso e Tocantins e a ausência de identificação do Estado de origem de alguns queijos.

No estudo conduzido por Rauecker (2007), o *C. estertheticum* também foi detectado em cortes cárneos embalados a vácuo, em amostras de ambientes e equipamentos de matadouros-frigoríficos e de fezes bovinas nos Estados do Mato Grosso do Sul, Pará, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso, Acre e Bahia.

Assim considerando, os resultados obtidos são preocupantes, pois independente do número de amostras positivas, a presença do microrganismo que durante a ordenha e/ou processamento de queijos houve contaminação de origem ambiental ou fecal, pode provocar contaminação do produto processado.

Tabela 9. Distribuição de *C. estertheticum* em amostras de leite cru e de queijos parmesão e provolone produzidos e/ou comercializados em Goiânia, Goiás, no período de fevereiro/2006 a janeiro/2007, segundo os Estados de origem. Goiânia-GO, 2007.

FONTES	ORIGEM GEOGRÁFICA											
	GO		MG		SP		MT		TO		Não Identificado	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Queijo Parmesão	2/11	18,2	0/7	0,0	1/5	20,0	0/3	0,0	0/0	0,0	1/3	33,3
Queijo Provolone	1/20	5,0	1/8	12,5	1/5	20,0	0/1	0,0	0/1	0,0	0/0	0,0
Queijo Ralado	2/11	18,2	2/4	50,0	5/12	41,7	1/2	50,0	0/0	0,0	0/2	0,0
Leite cru	11/32	34,4	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0
TOTAL	16/74	21,6	3/19	15,8	7/22	31,8	1/6	16,7	0/1	0,0	1/5	20,0

(+) resultado positivo ao PCR. (-) resultado negativo ao PCR. Nº: resultado obtido/amostras analisadas.

A Figura 9 apresenta a distribuição de *C. estertheticum* no total de amostras de leite cru, segundo os municípios goianos de colheita. Nota-se que em 21/32 (65,6%) amostras, o *C. estertheticum* não foi detectado, mas o microrganismo estava presente em amostras colhidas nos municípios de Piracanjuba, Hidrolândia, Inhumas e Professor Jamil. Assim como comentado anteriormente para os queijos, os percentuais de positividade nos municípios de colheita das amostras de leite não são relevantes, mas sim a detecção revelando a contaminação da matéria-prima na fonte de produção. Vale ressaltar que Broda et al. (2002) e Rauecker (2007) detectaram *C. estertheticum* na pele e fezes de bovinos e, ainda no solo, o que pode ser um indicativo da contaminação do leite no momento da ordenha, seja por contaminação ambiental ou por falhas na higienização do úbere da vaca no momento da ordenha.

A presença do microrganismo em leite cru preocupa sobremaneira devido à resistência do esporo ao tratamento térmico a 80°C por 10 minutos (COLLINS et al., 1992) podendo permitir seu aparecimento em queijos, como verificado no presente estudo, bem como em outros produtos lácteos.

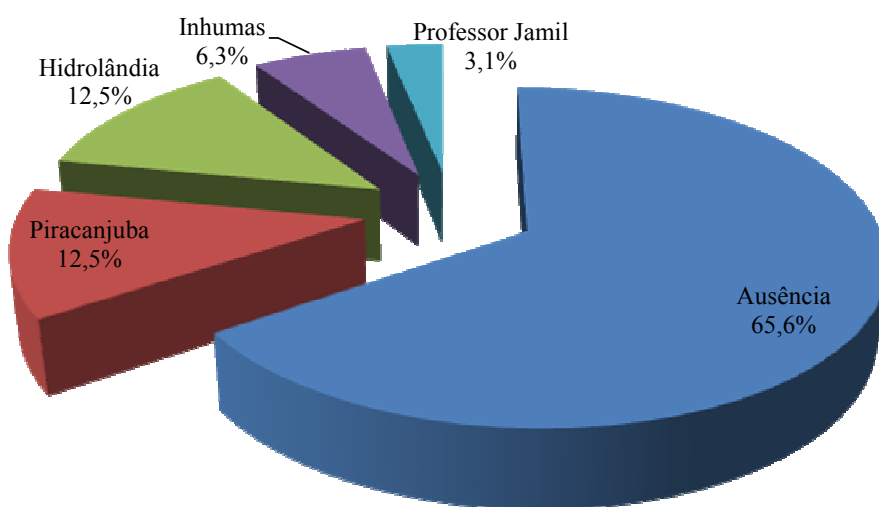


Figura 9. Distribuição de *C. estertheticum* detectados por PCR segundo os Municípios goianos de colheita das amostras de leite cru. Goiânia-GO, 2007.

5.6 Confirmação da identidade dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação purificados (Figura 10) obtidos com os pares RF/RR e 16SEF/16SER encaminhados para seqüenciamento foram parcialmente seqüenciados. Dos produtos obtidos com o par RF/RR foram seqüenciados 122pb dos 641pb (19,0%), e os obtidos com o 16SEF/16SER foram seqüenciados 135pb dos 790pb (17,0%).

Ao comparar os resultados obtidos das seqüências obtidas com as seqüências de referência depositadas no banco de dados do GenBank (GENBANK, 2007), foram verificados 99,0% de homologia com *C. estertheticum* para ambos os pares utilizados. Para o par RF/RR, a seqüência obtida foi similar às cepas de referência cujos números de acesso são S46734 (Figura 11) e X68181 (Figura 12) e para o par 16SEF/16SER a seqüência apresentou similaridade com a cepa de número X68181 (Figura 13). No entanto, outros microrganismos apresentaram similaridade, mas nenhum deles com determinantes de deterioração de leite e queijos.

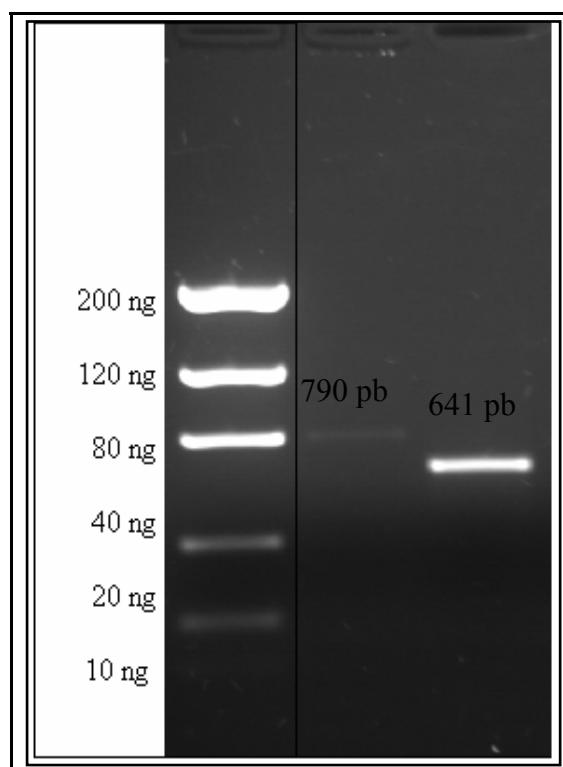


Figura 10. Concentração de *amplicons* de *C. estertheticum*. Canaleta 1 padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*, 2 *amplicon* de 790 pb (par 16SEF/16SER e 3 *amplicon* de 641 pb (par RF/RR).

```

16S rRNA [Clostridium estertheticum, NCIMB 12511, rRNA, 1427
nt]
Length=1427

Score = 220 bits (119), Expect = 6e-55
Identities = 121/122 (99%), Gaps = 0/122 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTAATCTCTA 60
      |||
Sbjct 730 CTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTAATCTCTA 671

Query 61 CGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGCACTCTAGACACCCAGTT 120
      |||
Sbjct 670 CGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGCACTCTAGACACCCAGTT 611

Query 121 TC 122
      ||
Sbjct 610 TC 609

```

Figura 11. Homologia de 99% resultante do alinhamento no programa BLAST (GENBANK, 2007) entre o resultado do seqüenciamento e a seqüência de referência para *C. estertheticum* (nº de acesso S46734) realizada com o par de *primers* RF/RR (HELPS; HARBOUR; CORRY, 1999).

```

C.estertheticum (NCIMB12511) rrn gene for 16S rRNA
Length=1435

Score = 220 bits (119), Expect = 6e-55
Identities = 121/122 (99%), Gaps = 0/122 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTAATCTCTA 60
      |||
Sbjct 738 CTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCTAATCTCTA 679

Query 61 CGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGCACTCTAGACACCCAGTT 120
      |||
Sbjct 678 CGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGCACTCTAGACACCCAGTT 619

Query 121 TC 122
      ||
Sbjct 618 TC 617

```

Figura 12. Homologia de 99% resultante do alinhamento no programa BLAST (GENBANK, 2007) entre o resultado do seqüenciamento e a seqüência de referência para *C. estertheticum* (nº de acesso X68181) realizada com o par de *primers* RF/RR (HELPS; HARBOUR; CORRY, 1999).

<i>C. estertheticum</i> (NCIMB12511) rrn gene for 16S rRNA Length=1435				
Score = 244 bits (132), Expect = 4e-62 Identities = 134/135 (99%), Gaps = 0/135 (0%) Strand=Plus/Minus				
Query	1	TCCCCACGCTTTCATGCCTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGGT	60	
Sbjct	755	TCCCCACGCTTTCATGCCTCAGCGTCAGTTACAGTCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGGT	696	
Query	61	GTACTTCCTAATCTCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGC	120	
Sbjct	695	GTTCTTCCTAATCTCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCACTTACCTCTCCTGC	636	
Query	121	ACTCTAGACACCCAG	135	
Sbjct	635	ACTCTAGACACCCAG	621	

Figura 13. Homologia de 99% resultante do alinhamento no programa BLAST (GENBANK, 2007) entre o resultado do seqüenciamento e a seqüência de referência para *C. estertheticum* (nº de acesso X68181) realizada com o par de *primers* 16SEF/16SER (BRODA; BOEREMA; BELL, 2003)

6. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O *C. estertheticum* foi detectado em amostras de leite cru e em queijos parmesão e provolone.
- O microrganismo foi detectado com maior eficiência, por meio da técnica de PCR, quando as amostras foram submetidas à extração do DNA genômico após pré-enriquecimento não seletivo.
- Para o par RF/RR o período de 10 dias de incubação revelou ser o mais adequado na detecção do microrganismo nas amostras analisadas.
- A associação dos pares de *primers* RF/RR e 16SEF/16SER revelou maior eficiência na detecção de amostras positivas em leite cru e queijos parmesão e provolone.
- O *C. estertheticum* foi detectado em amostras de queijos parmesão e provolone provenientes dos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso, indicando sua disseminação no país.
- O microrganismo também foi detectado em amostras de leite cru colhidas nos Municípios de Piracanjuba, Hidrolândia, Inhumas e Professor Jamil, do Estado de Goiás.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo: origem e tecnologia**. Juiz de Fora: Editora da Revista do I.L.C.T., v.1, 2002. 140p.
- ANUALPEC 2006. Pecuária de leite. In: **Anuário da Pesquisa Brasileira**. FNP Consultoria e Agroinformativos, 2006. 369p.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.
- BOEREMA, J. A.; BRODA, D. M.; BELL, R. G. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 406-411, 2003.
- BRASIL. **Decreto nº 2244, de 04 de junho de 1997a**. Altera dispositivos do decreto nº 30691, de 29 de março de 1952, que aprovou o regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, alterado pelos decretos nº 1255, de 25 de junho de 1962, nº 1236, de 2 de setembro de 1994 e nº 1812, de 8 de fevereiro de 1996. Publicado no Diário Oficial da União de 05/06/1997. Disponível em <www.anvisa.org.br>. Acessado em 19/06/2007.
- BRASIL. **Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952**. Aprova o novo regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Publicado no Diário Oficial da União de 07/07/1952. Disponível em <www.anvisa.org.br>. Acessado em 19/06/2007.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Publicado no Diário Oficial da União de 20/09/2002, Seção 1, Página 13. 2002. Disponível em <www.agricultura.org.br>. Acessado em 14/06/2007.
- BRASIL. **Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996**. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Publicado no Diário Oficial da União de 11/03/1996, Seção 1, Página 3977. 2002. Disponível em <www.agricultura.org.br>. Acessado em 14/06/2007.
- BRASIL. **Portaria nº 353, de 04 de setembro de 1997b**. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo parmesão, parmesano, reggiano, reggianito e sbrinz. Publicado no Diário Oficial da União de 08/09/1997, Seção 1, Página 16.684. 2002. Disponível em <www.agricultura.org.br>. Acessado em 14/06/2007.
- BRASIL. **Portaria nº 357, de 04 de setembro de 1997c**. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo ralado. Publicado no Diário Oficial da União de 08/09/1997, Seção 1, Página 19.688. 2002. Disponível em <www.agricultura.org.br>. Acessado em 14/06/2007.

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

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

BRODA, D. M.; DeLACY, K. M.; BELL, R. G.; BRAGGINS, T.; COOK, R. L. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 335-352, 1996.

CHAPMAN, H. R.; SHARPE, M. E. Microbiologia del queso. In: ROBINSON, R. K. **Microbiologia lactologica**: microbiologia de los productos lácteos. Zaragoza: Editorial Acribia, v.2, 1987. cap.5, p. 147-221.

COCOLIN, L.; INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; COMI, G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 83-91, 2004.

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

DAINTY, R. H.; EDWARDS, R. A.; HIBBARD, C. M. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 49, p. 1639-1645, 1989.

DNIT. Departamento Nacional de Infra-estrutura de transportes. Mapa rodoviário Goiás, 2002.

DUMAIS, R.; BLAIS, J. A.; CONRAD, F. Queso. In: AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**: principios y aplicaciones. Traduzido por Rosa Oria Almudé. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. cap. 4, p. 249- 296.

FARAH, S. B. DNA no diagnóstico das doenças humanas. In: _____. **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997. cap. 5, p. 103-140.

FURTADO, M. M. Defeitos relacionados com problemas de fermentação. In: _____. **Principais problemas dos queijos**: causas e prevenção. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. parte 2, p. 39-70.

FURTADO, M. M. **Manual prático da mussarela**: pizza cheese. Campinas: Master Graf, 1997. 70p.

FURTADO, M. M. O estufamento dos queijos. In: _____. **A arte e a ciência do queijo**. 2ª ed. São Paulo: Globo (Publicações Globo Rural), 1991. cap. 3, p. 35-72.

FURTADO, M. M. O estufamento tardio dos queijos: características e prevenção – uma revisão. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, n. 40, p. 3-39, 1985.

GENBANK. Entrez. **Nucleotide**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acessado em: 03 de abril 2007.

GU, J. *In Situ* PCR – an overview. In: _____. ***In Situ* polymerase chain reaction**. 1ª ed. Broens Mills: Birkhäuser Boston, 1995. p. 1-21.

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**, v. 52, n. 1-2, p. 57-65, 1999.

HERMAN, L. M. F.; BLOCK, J. H. G. E. de; WAES, G. M. A. V. J. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 4141-4146, 1995.

HERMAN, L.; BLOCK, J. de; VAN RENTERGHEM, R. Isolation and detection of *Clostridium tyrobutyricum* cells in semi-soft and hard cheeses using the polimerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 311-314, 1997.

HILL, W. E. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. 1-2, p. 123-173, 1996.

INGHAM, S. C.; HASSLER, J. R.; TSAI, Y-W.; INGHAM, B. H. Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 173-183, 1998.

JONSSON, A. Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, d-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 719-725, 1990.

KLIJN, N.; NIEUWENHOF, F. F. J.; HOOLWERF, J. D.; VAN der WAALS, C. B.; WEERKAMP, A. H. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2919-2924, 1995.

LE BOURHIS, A-G.; DORÉ, J.; CARLIER, J-P.; CHAMBA, J-F.; POPOFF, M-R.; THOLOZAN, J-L. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 154-163, 2007.

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**, v. 71, n. 1, p. 29-38, 2005.

MESQUITA, A. J. de; OLIVEIRA, A. N. de; BORGES, G. T.; NICOLAU, E. S.; SOUZA, A. A. G. D. Estudo quali-quantitativo da microbiota anaeróbia em amostras de queijos provolone, parmesão e prato. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 27-34, 2001.

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

OLSEN, J. E.; AABO, S.; HILL, W.; NOTERMANS, S.; WERNARS, S.; GRANUM, P. E.; POPOVIC, T.; RASMUSSEN, H. N.; OLSVIK, O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 1-78, 1995.

ORDOÑEZ (coord.). Queijos. In: _____. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**, v.2, Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.5, p.85-103.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p.293-300, 2004.

POWLEDGE, T. M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**, v. 28, p. 44-50, 2004.

PREVOT, A. R. Sporulales. In: _____. **Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria**. 1ª ed., Montreal: Lea & Febiger, 1966. cap. 6, p. 200-302.

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

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

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

RICHTER, R. L.; LEDFORD, R. A.; MURPHY, S. C. Milk and milk products. In: SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 1976. cap. 45, p.837-856.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SILIKER, J. H. (coord.). Leche y productos lácteos. In: _____. **Ecología microbiana de los alimentos: productos alimenticios**. v.2. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. cap. 18, p. 472-517.

SNEATH, P. H. A. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: MURRAY, R. G. E. (coord.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v. 2, Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. section 13, p. 1104-1207.

SPREER, E. Elaboración de queso (quesería). In: _____. **Lactología industrial**. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. cap. 7, p. 299-427.

SPRING, S.; MERKHOFFER, B.; WEIS, N.; KROPPENSTEDT, 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**, v. 53, p. 1019-1029, 2003.

SU; Y-C; INGHAM, S. C. Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. In Gouda cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 147-154, 2000.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; HAAS, P. E. W.; SOLL, D. R.; van EMBDEN, J. D. A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p 2578-2586, 1991.

WANG, R.-F.; CAO, W.-W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 727-736, 1997.

WASSERFALL, F.; TEUBER, M. Action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 197-199, 1979.

APÊNDICE A Relação das amostras de leite cru, segundo a temperatura do tanque de refrigeração por expansão direta, o município de procedência e resultados do PCR de acordo com os pares de *primers* utilizados.

Amostras	Temperatura do tanque de refrigeração	Procedência	<i>C. estertheticum</i>			
			RF/RR		16SEF/16SER	
			Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento	Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento
LC01	3,4°C	Caturaí	-	-	-	-
LC02	6,3°C	Caturaí	-	-	-	-
LC03	2,2°C	Inhumas	-	-	-	-
LC04	5,8°C	Inhumas	-	+	-	+
LC05	4,8°C	Inhumas	-	+	-	-
LC06	5,1°C	Goiânia	-	-	-	-
LC07	3,0°C	Inhumas	-	-	-	-
LC08	2,8°C	Inhumas	-	-	-	-
LC09	1,6°C	Inhumas	-	-	-	-
LC10	3,2°C	Prof. Jamil	-	-	-	+
LC11	4,1°C	Hidrolândia	-	-	+	-
LC12	1,8°C	Hidrolândia	-	-	-	+
LC13	3,2°C	Cromínia	-	-	-	-
LC14	4,3°C	Hidrolândia	-	-	-	-
LC15	3,2°C	Aragoiânia	-	-	-	-
LC16	5,2°C	Aragoiânia	-	-	-	-
LC17	5,3°C	Aragoiânia	-	-	-	-
LC18	3,9°C	Aragoiânia	-	-	-	-
LC19	4,4°C	Aragoiânia	-	-	-	-
LC20	4,4°C	Hidrolândia	-	-	-	-
LC21	5,2°C	Hidrolândia	-	+	-	-
LC22	5,0°C	Hidrolândia	-	+	-	-
LC23	3,4°C	Prof. Jamil	-	-	-	-
LC24	2,7°C	Prof. Jamil	-	-	-	-
LC25	5,4°C	Piracanjuba	-	-	+	-
LC26	2,7°C	Piracanjuba	-	-	-	-
LC27	3,6°C	Piracanjuba	-	+	-	-
LC28	3,1°C	Piracanjuba	-	-	-	-
LC29	4,3°C	Piracanjuba	-	+	-	-
LC30	3,0°C	Piracanjuba	-	+	-	-
LC31	5,0°C	Piracanjuba	-	-	-	-
LC32	3,5°C	Piracanjuba	-	-	-	-

RF: Revised Foward, RR: Revised Reverse; (+) resultado positivo para o PCR; (-) resultado negativo para o PCR

APÊNDICE B Relação das amostras de queijo parmesão, segundo sua forma de apresentação à venda, Estado de localização das indústrias e resultados do PCR de acordo com os pares de *primers* utilizados.

Amostras	Forma de apresentação	Aspecto do produto	UF	<i>C. estertheticum</i>			
				RF/RR		16SEF/16SER	
				Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento	Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento
PA01	F.I.	N	GO	-	-	-	-
PA02	F.I.	N	GO	-	-	-	-
PA03	P.I.	N	GO	-	-	-	+
PA04	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PA05	F.I.	N	GO	-	-	-	-
PA06	F.I.	N	GO	-	-	-	-
PA07	F.I.	N	MT	-	-	-	-
PA08	F.I.	N	GO	-	-	-	-
PA09	F.I.	D	MG	-	-	-	-
PA10	F.D.	N	MT	-	-	-	-
PA11	F.I.	N	SP	-	+	-	-
PA12	P.I.	N	MG	-	-	-	-
PA13	F.D.	N	s/ identificação	-	-	-	-
PA14	F.D.	N	s/ identificação	-	-	-	-
PA15	F.I.	N	MG	-	-	-	-
PA16	F.D.	D	MG	-	-	-	-
PA17	F.I.	N	GO	-	+	-	-
PA18	F.D.	D	s/ identificação	-	+	-	-
PA19	F.D.	D	MG	-	-	-	-
PA20	F.D.	N	SP	-	-	-	-
PA21	F.D.	N	SP	-	-	-	-
PA22	F.D.	D	GO	-	-	-	-
PA23	F.D.	D	MT	-	-	-	-
PA24	F.I.	D	GO	-	-	-	-
PA25	F.D.	D	MG	-	-	-	-
PA26	F.D.	D	SP	-	-	-	-
PA27	F.D.	N	SP	-	-	-	-
PA28	F.D.	D	MG	-	-	-	-
PA29	F.I.	D	GO	-	-	-	-

RF: Revised Forward, RR: Revised Reverse; F.I.: fracionado pela indústria, F.D.: fracionado pela rede de distribuição, P.I.: Peça inteira, N: normal, D: sinal de deterioração; (+) resultado positivo para o PCR; (-) resultado negativo para o PCR

APÊNDICE C Relação das amostras de queijo provolone, segundo sua forma de apresentação à venda, Estado de localização das indústrias e resultados do PCR de acordo com os pares de *primers* utilizados.

Amostras	Forma de apresentação	Aspecto do produto	UF	<i>C. estertheticum</i>			
				RF/RR		16SEF/16SER	
				Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento	Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento
PR01	F.I.	N	GO	-	-	-	-
PR02	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR03	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR04	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR05	F.I.	N	GO	-	-	-	-
PR06	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR07	P.I.	N	TO	-	-	-	-
PR08	P.I.	N	MT	-	-	-	-
PR09	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR10	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR11	F.I.	N	MG	-	-	-	-
PR12	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR13	F.I.	N	MG	-	-	-	-
PR14	F.D.	N	SP	-	-	-	-
PR15	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR16	F.I.	N	MG	-	-	-	-
PR17	F.I.	N	SP	-	-	-	-
PR18	P.I.	N	MG	-	-	-	-
PR19	P.I.	N	MG	-	-	-	-
PR20	F.D.	D	MG	-	-	-	-
PR21	F.D.	N	SP	-	+	-	-
PR22	P.I.	D	GO	+	+	-	-
PR23	F.I.	N	SP	-	-	-	-
PR24	F.I.	N	SP	-	-	-	-
PR25	F.D.	N	GO	-	-	-	-
PR26	F.D.	N	MG	-	-	+	+
PR27	F.D.	N	GO	-	-	-	-
PR28	F.D.	N	GO	-	-	-	-
PR29	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR30	P.I.	D	GO	-	-	-	-
PR31	P.I.	N	MG	-	-	-	-
PR32	F.D.	D	GO	-	-	-	-
PR33	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR34	P.I.	N	GO	-	-	-	-
PR35	P.I.	N	GO	-	-	-	-

RF: Revised Foward, RR: Revised Reverse; F.I.: fracionado pela indústria, F.D.: fracionado pela rede de distribuição, P.I.: Peça inteira, N: normal, D: sinal de deterioração; (+) resultado positivo para o PCR; (-) resultado negativo para o PCR

APÊNDICE D Relação das amostras de queijo parmesão (RA) e provolone (RO) ralado, segundo sua forma de apresentação à venda, Estado de localização das indústrias e resultados do PCR de acordo com os pares de *primers* utilizados.

Amostras	Forma de apresentação	Aspecto do produto	UF	<i>C. estertheticum</i>			
				RF/RR		16SEF/16SER	
				Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento	Sem pré-enriquecimento	Pré-enriquecimento
RA01	R.I.	N	GO	-	-	-	-
RA02	R.I.	N	GO	-	-	-	-
RA03	R.I.	N	GO	-	-	-	-
RA04	R.I.	N	GO	-	+	-	-
RA05	R.I.	N	GO	-	-	-	-
RA06	R.I.	N	MG	-	+	-	-
RA07	R.I.	N	MG	-	-	-	-
RA08	R.I.	N	GO	-	-	-	-
RA09	R.I.	N	MG	+	-	-	+
RA10	R.I.	N	SP	-	-	-	-
RA11	R.D.	N	GO	-	-	-	-
RA12	R.D.	D	MT	-	-	-	-
RO13	R.D.	N	GO	-	-	-	-
RA14	R.I.	D	SP	-	-	-	-
RO15	R.I.	D	SP	-	+	-	-
RA16	R.I.	N	SP	-	-	-	-
RA17	R.I.	N	SP	-	-	-	-
RA18	R.D.	N	s/ identificação	-	-	-	-
RA19	R.I.	N	GO	-	-	-	-
RA20	R.I.	N	SP	-	+	-	-
RA21	R.I.	N	SP	-	-	-	-
RA22	R.I.	N	SP	-	-	-	-
RA23	R.I.	N	SP	-	+	-	-
RA24	R.I.	N	MT	-	-	-	+
RA25	R.I.	N	SP	-	+	-	-
RA26	R.I.	N	MG	-	-	-	-
RA27	R.I.	N	GO	-	-	-	-
RA28	R.D.	N	s/ identificação	-	-	-	-
RA29	R.I.	N	SP	-	-	-	-
RA30	R.I.	D	SP	-	-	-	+
RA31	R.I.	N	GO	-	+	-	-

RF: Revised Foward, RR: Revised Reverse; F.I.: fracionado pela indústria, F.D.: fracionado pela rede de distribuição, P.I.: Peça inteira, N: normal, D: sinal de deterioração; (+) resultado positivo para o PCR; (-) resultado negativo para o PCR