

VIABILIDADE E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO CHURRASCO BOVINO

Mariana de Quadros Freitas¹

Ticiane da Rosa Pinheiro²

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia³

Resumo:

Instituído por lei estadual, o churrasco gaúcho é considerado o prato típico da região sul do Brasil e teve seus primeiros registros em meados do século XVIII. Composta principalmente por água e proteínas, a carne bovina é um alimento que fornece nutrientes e energia que auxiliam na manutenção de processos fisiológicos. Devido a sua constituição, é um ambiente propício a proliferação microbiana. Diversas condições favorecem a contaminação da carne bovina, como o processo de evisceração, a esfolagem, as mãos do manipulador, entre outros. Micro-organismos como *Acinetobacter* e *Flavobacterium*, que crescem na superfície do alimento e os *Lactobacillus* que predominam no seu interior, são exemplos de micro-organismos deteriorantes de produtos cárneos que podem causar alterações na cor, odor, textura e sabor. Os antimicrobianos são utilizados na agropecuária para promover crescimento, profilaxia e tratamento dos animais e o uso indiscriminado pode acabar gerando a presença de resíduos no produto cárneo, além de favorecerem o surgimento de bactérias resistentes. O objetivo deste trabalho foi identificar, avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a viabilidade de bactérias isoladas de carne bovina assada por meio de churrasco gaúcho. Foram adquiridas três amostras de carne bovina com peso equivalente a 600g cada. As amostras foram analisadas sendo: carne in natura, carne mal passada e carne assada. Foram pesados $25 \pm 0,2$ g e adicionados em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e após homogeneização foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} . Alíquotas de cada diluição foram semeadas nos meios de cultura ágar sangue e ágar MacConkey. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Foi realizada a técnica de coloração de gram, as provas de identificação bacteriana e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Trinta e quatro micro-organismos foram isolados e identificados, sendo os gêneros mais frequentes: *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. Também foram isolados *Listeria* spp. na carne in natura e assada e *Salmonella* spp. na carne mal passada. Os isolados de *Staphylococcus aureus* apresentaram resistência importante à clindamicina, penicilina e cefoxitina. Os micro-organismos termorresistentes permaneceram nas amostras, e ao contrário do que era esperado, na carne assada ainda estavam viáveis alguns desses micro-organismos, mostrando a resistência dessas bactérias mesmo com o aumento da temperatura.

Palavras-chave: carne bovina, resistência microbiana, churrasco, contaminação.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

VIABILIDADE E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO CHURRASCO BOVINO

¹ Aluno de graduação. marianaqfreitas@gmail.com. Autor principal

² Aluna de pós-graduação. ticianerp@yahoo.com.br. Co-autor

³ Docente. cheila.dos@gmail.com. Orientador

VIABILIDADE E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO CHURRASCO BOVINO

1. INTRODUÇÃO

Instituído por lei estadual, o churrasco gaúcho é considerado o prato típico da região sul do Brasil e teve seus primeiros registros em meados do século XVIII, quando a região sofria uma disputa entre Portugal e Espanha, ocasionando o declínio dos Sete Povos das Missões. Como resultado dessa disputa, os rebanhos de gado eram abandonados a livre campo, virando alvo dos gaúchos que saíam à caça em busca de sebo e couro. Como a carne bovina não era desejada pelo comércio na época, era utilizada apenas para consumo (ALBRECHT, 2010; MACIEL, 1996).

Composta principalmente por água e proteínas, a carne bovina é um alimento muito valorizado para o consumo, fornecendo nutrientes e energia que auxiliam na manutenção de processos fisiológicos. Contudo, devido sua grande atividade de água, a carne é um ambiente propício a proliferação microbiana. Mesmo que os tecidos internos dos animais sadios sejam considerados estéreis antes do abate, existem diversas condições que favorecem a contaminação da carne bovina, como por exemplo, o processo de evisceração, as mãos do manipulador, a água utilizada na lavagem das carcaças, entre outros (FONTOURA, 2006; HEDRICK *et al.*, 1994).

Micro-organismos como *Acinetobacter* e *Flavobacterium*, que crescem na superfície do alimento e os *Lactobacillus* que predominam no seu interior, são exemplos de micro-organismos deteriorantes de produtos cárneos que dependendo das condições podem causar alterações na cor, odor, textura, sabor, ou aspecto desses produtos, consequentes da atividade metabólica dos micro-organismos presentes. Esse processo de deterioração pode ser influenciado pela atmosfera que envolve o produto (aerobiose ou anaerobiose) bem como a temperatura, haja vista que muitos micro-organismos são resistentes a baixas e altas temperaturas (FONTOURA, 2006; ALCANTARA, 2012).

Amplamente utilizado na agropecuária, os antimicrobianos, agem como promotores de crescimento, profilaxia e tratamento dos animais, sendo muito comum o uso de medicamentos e aditivos incorporados nas rações (ANDREOTTI, 2004). Contudo, o uso indiscriminado desses medicamentos e o descumprimento do período de administração do medicamento e abate, acabam gerando a presença de resíduos de antimicrobianos no produto cárneo, nas fezes dos animais, no solo, além de favorecerem o surgimento de bactérias resistentes que facilmente podem chegar ao nosso consumo (BRITO & PORTUGAL, 2003).

Frente ao exposto, este trabalho teve por objetivo comparar, identificar e avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a viabilidade de bactérias isoladas de carne bovina assada por meio de churrasco gaúcho.

2. METODOLOGIA

Foram realizados três ensaios e para cada ensaio, foram adquiridas três amostras de carne bovina, do corte tipo capa de filé, com peso equivalente a 600g cada, adquiridas em dois supermercados e um açougue, da cidade de Uruguaiana – RS, armazenadas em embalagens plásticas, conforme fornecidas pelo estabelecimento de compra, e mantidas em refrigeração até o momento de assá-las. As amostras foram analisadas em diferentes momentos, sendo: carne *in natura*, carne mal passada e carne assada. Para preparo das amostras, foram pesados $25 \pm 0,2$ g retirados assepticamente da parte interna da amostra de carne e adicionados em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. As amostras foram homogeneizadas em câmara incubadora com agitação orbital no tempo de 18h a uma temperatura de 15°C. As diluições seriadas foram realizadas em escala de 10^{-1} a 10^{-5} e alíquotas de cada diluição foram semeadas nas placas de Petri contendo os meios de cultura ágar sangue (AS) e ágar MacConkey (MC).

As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Os ensaios foram feitos em duplicata. Posteriormente, foi realizada a técnica de coloração de gram e as provas de identificação. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco difusão em ágar, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trinta e quatro micro-organismos foram isolados e identificados a partir dos três experimentos realizados, conforme Tabela 1 e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados aparecem descritos nas Tabelas 2 a 5.

Tabela 1 – Zoneamento dos micro-organismos identificados.

Micro-organismo	Nº	Micro-organismos
Carne crua	16	<i>Acinetobacter</i> spp. (n=1)
		<i>Citrobacter</i> spp. (n=6)
		<i>Enterobacter</i> spp. (n=2)
		<i>Klebsiella</i> spp. (n=3)
		<i>Listeria</i> spp. (n=2)
		<i>Serratia</i> spp. (n=1)
		<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (n=1)
Carne mal passada	12	<i>Citrobacter</i> spp. (n=1)
		<i>Enterobacter</i> spp. (n=3)
		<i>Klebsiella</i> spp. (n=4)
		<i>Salmonella</i> spp. (n=1)
		<i>Staphylococcus aureus</i> (n=2)
		<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (n=1)
Carne assada	06	<i>Citrobacter</i> spp. (n=2)
		<i>Klebsiella</i> spp. (n=1)
		<i>Listeria</i> spp. (n=2)
		<i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 2 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias isoladas.

Micro-organismos	Isolados	TOB	AMP	CFZ	ERT	AMC
<i>Citrobacter</i> spp.	09	0/9 R	3/9 R	8/9 R	0/9 R	1/9 R
<i>Klebsiella</i> spp.	08	0/8 R	3/8R	7/8 R	1/8 R	1/8 R
<i>Enterobacter</i> spp.	05	0/5 R	0/5 R	4/5 R	0/5 R	0/5 RS
<i>Salmonella</i> spp.	01	0/1 R	1/1 R	1/1 R	0/1 R	0/1 R
<i>Serratia</i> spp.	01	0/1 R	1/1 R	1/1 R	0/1 R	1/1 R

Fonte: dados da pesquisa. TOB = tobramicina; AMP = ampicilina; CFZ = cefazolina; ERT = ertapenem; AMC = amoxicilina+clavulanato; R= resistente.

Tabela 3 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos cocos gram-positivos isolados.

Micro-organismos	Isolados	AZI	CLI	PEN	CFO
<i>Staphylococcus aureus</i>	03	0/3 R	3/3 R	3/3 R	3/3 R
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	02	0/2 R	2/2 R	2/2 R	2/2 R

Fonte: dados da pesquisa. AZI = azitromicina; CLI = clindamicina; PEN = penicilina; CFO = cefoxitina; R= resistente.

Tabela 4 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos bacilos gram-positivos isolados.

Micro-organismos	Isolados	AZI	CLI	PEN
<i>Listeria</i> spp.	04	0/4 R	0/4 R	4/4 R

Fonte: dados da pesquisa. ERI = eritromicina; CLI = clindamicina; PEN = penicilina; R= resistente.

Tabela 5 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos do coco gram-negativo isolado.

Micro-organismos	Isolados	TOB	LEV	APS	MPM	AMI
<i>Acinetobacter</i> spp.	01	0/1 R	0/1 R	0/1 R	0/1 R	0/1 R

Fonte: dados da pesquisa. TOB= tobramicina; LEV = levofloxacino; APS = ampicilina+sulbactam; MPM = meropenem; AMI = amicacina; S= sensível.

Segundo a RDC nº12 de janeiro de 2001 da ANVISA, é exigida a ausência dos micro-organismos *Salmonella* spp. em 25g de carne crua e produtos cárneos prontos para o consumo (ANVISA, 2001). Nesse estudo, foi identificado um isolado de *Salmonella* spp. em uma amostra de 25g de carne mal passada (Tabela 1). Assim como a *Salmonella*, a *Listeria* spp. também é um micro-organismo inaceitável em 25g de carne crua. Por tratar-se de um micro-organismo com capacidade de produzir enzimas proteolíticas ou lipolíticas termorresistentes, consegue manter sua viabilidade por maior período de tempo no alimento, mesmo após ação da temperatura. O número de isolados desse gênero bacteriano mostra-se superior a estudo realizado por Lambertz, em 2010, na Suécia, que analisou a prevalência e os níveis de *Listeria monocytogenes* em três categorias de alimentos, entre elas, alimentos cárneos prontos para o consumo, e encontrou esse micro-organismo em apenas seis das 507 amostras de carnes analisadas. Nossos dados são numericamente superiores aos relatados, quando comparados ao número total de amostras analisadas, o que gera um alerta maior, tendo em vista que por serem resistentes a altas temperaturas foram encontrados também, na carne assada. Os isolados apresentaram resistência à penicilina, resultado semelhantemente ao estudo feito por Palma e colaboradores (2017), onde as 11 cepas de *Listeria monocytogenes* a partir de amostras de cortes bovinos, apresentaram resistência a penicilina.

Os gêneros mais frequentes identificados em nossos resultados foram *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., que corroboram com estudo de Sousa e colaboradores (2007) que realizou a identificação de bactérias em amostras de carne de caranguejo *in natura* e dentre as diferentes espécies identificadas, os gêneros *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxycota*, *Citrobacter amalonaticus* e *Citrobacter* spp. foram isolados da carne de caranguejo *in natura*. O gênero *Citrobacter* teve o número de micro-organismos isolados reduzido nas amostras de carne mal passada e assada, mas o gênero *Klebsiella* manteve-se constante, mesmo após a amostra ter sido submetida a altas temperaturas.

Os isolados de *Staphylococcus* apareceram em número reduzido e constante nos três tipos de amostra. Além disso, esses isolados apresentaram perfil de resistência à clindamicina,

penicilina e cefoxitina, apresentando suscetibilidade apenas para azitromicina, reportando nossos resultados como resistente também a outros beta-lactâmicos, dentre eles a penicilina, restringindo a possibilidade de tratamento em casos de infecções por esse micro-organismo.

De acordo com a Tabela 1 onde foi estabelecido o zoneamento dos micro-organismos isolados, pode-se perceber que a carne crua foi o tipo de amostra que mais se isolou micro-organismos. Com a ação da temperatura, os micro-organismos termorresistentes permaneceram viáveis nas amostras, e ao contrário do que era esperado, na carne assada ainda permaneceram-se viáveis alguns desses micro-organismos, mostrando então a grande resistência dessas bactérias mesmo com a ação do aumento da temperatura.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, a identificação de micro-organismos considerados causadores de infecções alimentares, a resistência antimicrobiana relatada em diferentes micro-organismos e a presença de micro-organismos termorresistentes é um fator de alerta relacionado à saúde humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, C.F. **Além da carne assada sobre brasas: os elementos da experiência de consumo do churrasco**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Administração, Programa de Pós Graduação em Administração, 2010.

ALCANTARA, Marcela de; MORAIS, Isabela C. L. de; MATOS, Cyllene de; SOUZA, Ornelas da C. C. de. **Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.6, n.1) p. 1 – 18 jan – jun (2012).

ALCÂNTARA, Michele A.; GATTO, Igor R. H.; KOZUSNY-ANDREANI, Dora I. Ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de cortes de carne bovina. **Veterinária em Foco**. Canoas v.10 n.1 p.80-92, jul./dez. 2012.

ANDREOTTI, Renato; NICODEMO, Maria Luiza Franceschi. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência**. Embrapa Gado de Corte, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos de alimentos. DOU, Brasília, 2001. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

BRITO, J.R.F; PORTUGAL, J.A.B; **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos e antibióticos**. Embrapa Gado de Leite, EPAMIG, Juiz de Fora, 2003.

CLSI. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição**, 2015. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf> Acesso em: 06 de abril de 2018.

FONTOURA, C. L. **Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante**. Jaboticabal, 2006.

HEDRICK, H. B.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; JUDGE, M. D.; MERKEL, R. A. **Principles of meat science**. 3th ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 1994. cap. 8, p.173-174.

LAMBERTZ, S. Thisted et al. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 24-31, 2012.

MACIEL, Maria Eunice. **Churrasco à Gaúcha**. **Horizontes Antropológicos**, v. 2, n. 4, p. 34-48, jan./jun. 1996.

PALMA, Joana M. et al. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 957-964, 2017.

SOUSA, M.M.; CORREIA, M.M.F.; NASCIMENTO, R. A. Análise Microbiológica do Caranguejo Uçá, *Ucidescordatus* (Linnaeus, 1763), como bioindicador ambiental dos manguezais do Rio Paciência, Ilha de São Luís-MA. **Sociedade de Ecologia do Brasil**. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007.