

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**



Dissertação

**Caracterização fenotípica, molecular e avaliação do potencial tecnológico de
Estafilococos coagulase negativa isolados de queijos da região sudoeste do
Rio Grande do Sul/Brasil**

**Claudio Eduardo dos Santos Cruxen
Tecnólogo em Agroindústria**

Pelotas, 2016

Claudio Eduardo dos Santos Cruxen

**Caracterização fenotípica, molecular e avaliação do potencial tecnológico de
Estafilococos coagulase negativa isolados de queijos da região sudoeste do
Rio Grande do Sul/Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C955c Cruxen, Claudio Eduardo dos Santos

Caracterização fenotípica, molecular e avaliação do potencial tecnológico de *Estafilococos* coagulase negativa isolados de queijos da região sudoeste do Rio Grande do Sul/Brasil / Claudio Eduardo dos Santos Cruxen ; Angela Maria Fiorentini, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, coorientador. — Pelotas, 2016.

76 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. *S. xylosus*. 2. Biodiversidade. 3. Atividade enzimática. 4. Culturas iniciadoras. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD : 576.19

Claudio Eduardo dos Santos Cruxen

**Caracterização fenotípica, molecular e avaliação do potencial tecnológico de
Estafilococos coagulase negativa isolados de queijos da região sudoeste do
Rio Grande do Sul/Brasil**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2016.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini (Presidente)
Doutora em Ciências dos Alimentos – UFSC

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Doutor em Ciências dos Alimentos – USP

Profa. Dra. Claudia Hernandez Ogeda
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) – UFRGS

Dra. Márcia Magalhães Mata
Doutora em Biotecnologia – UFPel

Profa. Dra. Angelita da Silveira Moreira
Doutora em Biotecnologia - UFPel

Agradecimentos

A Deus pela vida e saúde.

Aos meus pais Aracely e Clovis pelo incentivo em trilhar o caminho dos estudos.

À minha família pelo carinho.

Aos amigos que compreenderam os momentos de ausência e pela parceria nos momentos agradáveis e difíceis. Em especial ao colega de mestrado e de morada Abílio Vaz Gonçalves que muito estudamos em parceria para compreender temáticas complicadas no início, e após longas leituras e debates se tornaram claras e compreensíveis.

Aos mestres, em especial, à Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini (orientadora) e ao Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (co-orientador), que formaram meu comitê de orientação e me auxiliaram sobremaneira durante os estudos. Ao Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves por me auxiliar na resolução de dúvidas ao longo do mestrado.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos que me receberam em Pelotas e fizeram os dias de trabalho muito agradáveis, que fizeram a diferença nas festas e que foram extraordinariamente importantes para minha formação. Aos demais colegas dos “LABs frutas e grãos” pelos auxílios na utilização de equipamentos, empréstimo de materiais e reagentes.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À banca examinadora por aceitarem o convite e contribuírem para minha formação.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

Resumo

CRUXEN, Claudio Eduardo dos Santos. **Caracterização fenotípica, molecular e avaliação do potencial tecnológico de Estafilococos coagulase negativa isolados de queijos da região sudoeste do Rio Grande do Sul/Brasil**. 2016. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Diversos estudos têm sido conduzidos mundialmente visando isolar Estafilococos Coagulase Negativa (ECN) de produtos artesanais/locais, com a intenção de caracterizar esses isolados e verificar seu potencial de utilização como culturas iniciadoras em embutidos cárneos fermentados. Um dos principais motivos de se explorar a biodiversidade nativa é isolar micro-organismos adaptados às condições ambientais, ecológicas e tecnológicas que pode lhes proporcionar maior capacidade para competir e se desenvolver no produto. Outro fator importante é que a microbiota nativa de determinada região pode apresentar um perfil enzimático diferenciado, que produz características peculiares aos produtos locais, contribuindo para a formação de um padrão de identidade. Poucos pesquisadores têm explorado a biodiversidade de ECN em produtos lácteos e verificado seu potencial tecnológico. Objetivou-se caracterizar e avaliar o potencial tecnológico e os aspectos de segurança de ECN isolados de queijos. Foi avaliado o potencial tecnológico, bem como a segurança microbiológica e toxicológica por meio de análises fenotípicas e moleculares. Foi possível caracterizar e identificar fenotipicamente 17 isolados, como cocos Gram-positivos, catalase-positiva e coagulase-negativa em *Staphylococcus saprophyticus* (n=14), *Staphylococcus xylosus* (n=2) e *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* (n=1) pelo sistema Vitek. Após identificação molecular, apenas um isolado, LQ3, foi confirmado como *S. xylosus*. Os resultados demonstraram que o isolado *S. xylosus* LQ3 apresentou atividade lipolítica, proteolítica, reduziu nitratos (25 e 35 °C) e apresentou atividade superóxido dismutase ($9,43 \pm 1,43\%$). O isolado LQ3 demonstrou segurança microbiológica e toxicológica, conforme os resultados obtidos. Foi sensível aos antimicrobianos testados e não apresentou nenhum gene de resistência, bem como ausência de atividade hemolítica e DNase. O isolado também demonstrou ausência dos genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas, e não apresentou os genes histidina (*hdc*) e tirosina descarboxilase (*tyrdc*). *Staphylococcus xylosus* LQ3 possui um potencial promissor, tanto pelas propriedades tecnológicas quanto pelos aspectos de segurança. Futuramente poderá ser aplicado na composição de culturas iniciadoras para fermentação de embutidos cárneos.

Palavras-chave: *S. xylosus*; biodiversidade; atividade enzimática; culturas iniciadoras

Abstract

CRUXEN, Claudio Eduardo dos Santos. **Phenotypic, molecular characterization and assessment of technological potential of coagulase-negative staphylococci isolated from cheeses of the southwest region of Rio Grande do Sul/Brazil**. 2016. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Several studies have been conducted worldwide aiming to isolate CNS from handmade/local products with the intention of characterizing these isolates and verifying their potential to use as starter cultures in fermented sausage. One of the main reasons to explore native biodiversity is to isolate microorganisms adapted to the environmental, ecological and technological conditions that can provide them a greater ability to compete and grow when added to the product. Another important factor is that native flora can have a different enzymatic profile, which produces peculiar characteristics to local products, contributing to the standard of identity for food. Few researchers have explored the biodiversity of CNS in dairy products. The current study aimed to characterize and evaluate the technological potential and safety aspects of coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from cheeses. The technological potential, as well as the microbiological and toxicological safety, were evaluated by phenotypic and molecular analysis. It was possible to characterize and identify phenotypically 17 isolates as Gram-positive, catalase-positive and coagulase-negative cocci. The isolates were identified as *Staphylococcus saprophyticus* (n=14), *Staphylococcus xylosus* (n=2) and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* (n=1) by Vitek system. After molecular identification, only one isolate, LQ3, was confirmed as *S. xylosus*. The results showed that *S. xylosus* LQ3 harboured lipolytic, proteolytic, nitrate reductase (25 and 37 °C) and superoxide dismutase ($9.43 \pm 1.43\%$) activity. Isolate LQ3 showed microbiological and toxicological safety as the results obtained. Furthermore, LQ3 was sensitive to all antimicrobials tested and did not show any antimicrobial resistance gene or hemolytic and DNase activity. No genes encoding for classical staphylococcal enterotoxins, histidine decarboxylase (*hdc*) and tyrosine decarboxylase (*tyrdc*) were identified. *Staphylococcus xylosus* LQ3 showed promising potential due to the good technological properties identified, as well as, the safety aspects. In the future, this isolate could be applied as a starter culture for meat sausage production.

Key-words: *S. xylosus*; biodiversity; enzymatic activities; starter culture

Lista de Figuras

Figura 1	Reações químicas que ocorrem a partir do nitrato de sódio até a formação de nitrosomioglobina	20
Figura 2	Transferência de plasmídeo por conjugação	24
Figura 3	Equipamento Vitek ®2 e cartões para identificação de bactérias Gram-positivas	31
Figura 4	Produtos da amplificação do gene 16S rDNA (252 pb) e do gene espécie específico para <i>S. xylosus</i> (539 pb)	43

Lista de tabelas

Tabela 1	Oligonucleotídeos e cepas controle utilizadas para detecção de genes de resistência à antimicrobianos	36
Tabela 2	Micro-organismos patogênicos utilizados para verificação da atividade antagonista por <i>S. xylosus</i> LQ3	39
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes envolvidos na produção de enterotoxinas e aminos biogênicas	41
Tabela 4	ECN identificados por sequenciamento da região 16S rDNA	44
Tabela 5	Tolerância ao cloreto de sódio, pH, temperatura e simulação <i>in vitro</i> de um produto cárneo fermentado	45
Tabela 6	Propriedades tecnológicas enzimáticas de <i>S. xylosus</i> LQ3	47
Tabela 7	Avaliação da suscetibilidade do isolado <i>S. xylosus</i> LQ3 aos antimicrobianos	47

Lista de Abreviaturas e Siglas

AB	Amina biogênica
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECN	Estafilococos coagulase negativa
ECP	Estafilococos coagulase positiva
GCC ⁺	Cocos Gram positivos e catalase positiva
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SLC	Sobrenadante livre de células
SOD	Superóxido dismutase
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
M	molar
mM	milimolar
mm	milímetros
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
%	Porcentagem

Sumário

1.	Introdução.....	12
2.	Objetivos.....	15
2.1..	Objetivo geral.....	15
2.1.	Objetivos específicos.....	15
3.	Referencial teórico.....	16
3.1.	Conservação de alimentos por fermentação.....	16
3.2.	Culturas iniciadoras em embutidos cárneos fermentados.....	17
3.3.	Estafilococos coagulase negativa.....	18
3.4.	Propriedades tecnológicas.....	19
3.4.1.	Tolerância a presença de Nitrito de sódio (NaNO ₂), pH ácido, concentração de NaCl e diferentes temperaturas.....	19
3.4.2.	Atividade nitrato redutase.....	20
3.4.3.	Atividade catalase e superóxido dismutase.....	21
3.4.4.	Atividade proteolítica e lipolítica	22
3.5.	Segurança microbiológica.....	23
3.5.1.	Atividade antagonista contra bactérias deteriorantes e patogênicas.....	23
3.5.2.	Resistência a antimicrobianos.....	24
3.5.3.	Atividade hemolítica e DNase.....	25
3.6.	Segurança toxicológica.....	26
3.6.1.	Formação de aminas biogênicas.....	26
3.6.2.	Degradação de aminas biogênicas.....	27
3.6.3.	Produção de enterotoxinas causadoras de intoxicação alimentar.....	28
4.	Material e Métodos.....	30
4.1.	Amostras.....	30
4.2.	Isolamento.....	30
4.3.	Caracterização e identificação fenotípica.....	30
4.4.	Identificação molecular.....	31
4.4.1.	Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.....	31

4.4.2. Identificação de <i>Staphylococcus xylosus</i>	32
4.5. Determinação das propriedades tecnológicas.....	32
4.5.1. Tolerância ao cloreto de sódio, pH, temperatura e simulação <i>in vitro</i> de um produto cárneo fermentado.....	32
4.5.2. Atividade proteolítica e lipolítica.....	33
4.5.3. Atividade nitrato redutase.....	34
4.5.4. Atividade superóxido dismutase.....	34
4.6. Segurança microbiológica e toxicológica.....	35
4.6.1. Avaliação da resistência fenotípica e genotípica a antimicrobianos.....	35
4.6.2. Atividade Hemolítica.....	38
4.6.3. Atividade DNase.....	38
4.6.4. Atividade antagonista contra bactérias patogênicas.....	38
4.6.5. Atividade antagonista do sobrenadante livre de células.....	39
4.6.6. Detecção de genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas.....	40
4.6.7. Detecção dos genes histidina e tirosina descarboxilase.....	40
5. Resultados e discussão.....	42
5.1. Isolamento, caracterização e Identificação fenotípica.....	42
5.2. Identificação de gênero e espécie por técnicas moleculares.....	43
5.3. Propriedades tecnológicas.....	44
5.3.1. Tolerância ao cloreto de sódio, pH, temperatura e simulação <i>in vitro</i> de um produto cárneo fermentado.....	44
5.3.2. Atividade proteolítica, lipolítica, nitrato redutase e superóxido dismutase..	45
5.4. Segurança microbiológica e toxicológica.....	47
5.4.1. Avaliação fenotípica e genotípica de resistência a antimicrobianos.....	47
5.4.2. Atividade hemolítica e DNase.....	48
5.4.3. Atividade antagonista contra bactérias patogênicas.....	48
5.4.4. Atividade antagonista do sobrenadante livre de células.....	49
5.4.5. Verificação de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas.....	50
5.4.6. Detecção dos genes histidina e tirosina descarboxilase	50
6. Considerações Finais	51
Referências.....	52
Apêndice A - Fotos de géis de agarose referente aos produtos de PCR de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos	64

Apêndice B – Fotos de géis de agarose referente aos produtos de PCR dos genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas	69
Apêndice C - Atividade lipolítica	71
Apêndice D - Atividade proteolítica	72
Apêndice E - Atividade nitrato redutase	73
Apêndice F - Atividade hemolítica e DNase	74
Apêndice G – Antagonismo de <i>S. xylosus</i> LQ3 contra bactérias patogênicas	75
Apêndice H - Atividade do sobrenadante livre de células	76

1. Introdução

A família Staphylococcaceae é formada por bactérias ubíquas, encontradas na pele e mucosas de animais de sangue quente. Também podem ser isoladas a partir de fontes ambientais, tais como solo, ar, água e diversos alimentos, incluindo produtos cárneos fermentados e queijos (KLOOS e SCHLEIFER, 1986; BLAIOTTA et al., 2004). Suas diferentes espécies são agrupadas em estafilococos coagulase positiva (ECP), importantes agentes patogênicos em humanos (WERTHEIM et al., 2005) e estafilococos coagulase negativa (ECN), que compreendem espécies reconhecidas pela sua importância tecnológica na indústria de alimentos, como por exemplo, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus* (BLAIOTTA et al., 2004; IRLINGER, 2008).

A fabricação de embutidos cárneos fermentados se baseia nas mudanças bioquímicas, físicas e sensoriais que ocorrem na massa cárnea, sob condições de temperatura e umidade controladas (CASABURI et al., 2007). E para o processo fermentativo ocorrer é necessária a participação de bactérias ácido lácticas (BAL) e ECN (ESSID E HASSOUNA, 2013). As BAL possuem como principal função reduzir o pH pela formação de ácido láctico (DROSINOS et al., 2007), enquanto as espécies de ECN possuem como característica importante a capacidade de reduzir nitratos em nitritos, contribuindo para a formação de cor vermelha característica do produto pela formação de nitrosomioglobina (TALON et al., 1999). A atividade proteolítica e lipolítica desse grupo de micro-organismos é responsável pelas características sensoriais por meio da liberação de substâncias aromáticas e ácidos orgânicos. Esses compostos apresentam baixo peso molecular, incluindo aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos livres (SIMONOVÁ et al., 2006). Além disso, por serem catalase positiva e por apresentarem atividade superóxido dismutase, possuem capacidade antioxidante, reduzindo a formação de compostos indesejáveis precursores do ranço oxidativo (BARRIÈRE et al., 2001).

A fermentação espontânea de embutidos cárneos, isto é, pela presença de bactérias autóctones atribui aos produtos características peculiares de textura, sabor

e aroma (FIORENTINI, et al., 2009; TALON, LEROY E LEBERT, 2007). Entretanto, não é possível saber quais espécies de micro-organismos participaram da fermentação. Sendo assim, não se pode assegurar que essa microbiota nativa seja segura do ponto de vista microbiológico e toxicológico.

Algumas espécies presentes na fermentação espontânea de embutidos cárneos podem apresentar resistência aos antimicrobianos pela presença de genes de resistência em elementos genéticos móveis como plasmídeos e *transposons*. Essa característica tem sido demonstrada na literatura onde vários trabalhos relatam o isolamento de espécies de ECN resistentes a antimicrobianos, podendo, inclusive, ocorrer transferência destes genes a outros micro-organismos comensais e/ou patogênicos (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; LEVY e MARSHALL, 2004; LOZANO et al., 2012; RESCH, NAGEL e HERTEL, 2008). A microbiota presente naturalmente no alimento também pode apresentar genes que codificam para enterotoxinas estafilocócicas e genes envolvidos na descarboxilação de aminoácidos, sugerindo um potencial risco a saúde do consumidor (LANDETA et al., 2007; ZELL et al., 2008).

Em contraste com essas características que podem afetar negativamente, é importante destacar que a microbiota nativa presente em produtos artesanais apresenta uma vantagem adicional, já que se encontra adaptada às condições climáticas, tecnológicas e ecológicas que conferem à mesma maior eficiência para competir e se desenvolver no produto (MUREDDU et al., 2013). Além disso, o perfil enzimático desses micro-organismos, possivelmente contribuirá para produção de um produto com sabor genuíno (FIORENTINI et al., 2009a; TALON et al., 2007). A seleção e caracterização de bactérias nativas provenientes de alimentos artesanais/locais possibilita acrescentar um diferencial ao produto, preservando as características originais e garantindo segurança microbiológica e toxicológica.

Nesse sentido, vários pesquisadores têm isolado ECN de produtos cárneos artesanais na Itália (BONOMO et al., 2009), no Brasil (FIORENTINI et al., 2009a), na Espanha (LANDETA et al., 2013), entre outros, com a intenção de caracterizar esses isolados e inferir sobre seu potencial de aplicação como culturas iniciadoras em embutidos cárneos fermentados. Salienta-se que, normalmente, ECN são isolados a partir de produtos cárneos e, poucos pesquisadores têm explorado a biodiversidade de ECN em produtos lácteos como, por exemplo, Ruaro et al. (2013)

que isolou ECN de queijos e leite cru. É importante também avaliar o perfil de ECN, principalmente as espécies de importância tecnológica, isolado a partir de produtos lácteos, para que se possa obter conhecimento acerca de novas linhagens que possuam um perfil enzimático desejado e que apresentem segurança microbiológica e toxicológica.

Diante do exposto, no presente estudo, objetivou-se caracterizar e avaliar o potencial tecnológico, bem como os aspectos de segurança de ECN provenientes de queijos, com diferentes teores de umidade, comercializados na Região Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Isolar, caracterizar e avaliar o potencial tecnológico e os aspectos de segurança de *Estafilococos Coagulase Negativa* (ECN) provenientes de queijos, para aplicação como culturas iniciadoras em embutidos cárneos.

2.2. Objetivos específicos

Isolar e caracterizar fenotípica e molecularmente os isolados de ECN.

Avaliar o potencial tecnológico dos isolados de ECN.

Avaliar a segurança microbiológica e toxicológica dos isolados de ECN.

3. Referencial teórico

3.1. Conservação de alimentos por fermentação

Antigamente, há cerca de 10 mil anos, o homem se alimentava de alimentos frescos basicamente de caças e frutos. A população era nômade e não armazenava alimentos para serem consumidos em um futuro próximo. Quando o homem fixou-se em determinada região, período Neolítico, onde plantava e criava animais, houve um considerável aumento na oferta de alimentos que acarretou num excedente de produção (MAZOYER e ROUDART, 2010).

A conservação de alimentos surgiu pela necessidade que o homem possuía em evitar a degradação dos alimentos. Neste sentido, algumas técnicas de conservação, ainda que primitivas, começaram a surgir como a salga, calor do fogo, defumação e fermentação. A produção de embutidos crus foi uma das formas que o homem da Antiguidade encontrou para aumentar a vida útil da carne, sendo a mesma picada, misturada ao sal e a ervas aromáticas para ser embutida e dessecada. Existem relatos que os embutidos crus tiveram sua origem na região mediterrânea, cujo clima era muito favorável para sua maturação (ORDÓÑEZ, 2005). Esses embutidos crus desenvolvidos na Antiguidade estão baseados na conservação pela fermentação, que consiste na atividade biológica de micro-organismos com produção de ácidos orgânicos, peróxidos de hidrogênio, dióxido de carbono e outros metabólitos que inibem o crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas (AMMOR e MAYO, 2007). Além disso, o acúmulo de ácidos orgânicos proveniente da fermentação reduz o pH até que alcance o ponto isoelétrico das proteínas, com isso a capacidade de retenção de água diminui, implicando em decréscimo da atividade de água (a_w). A a_w reduz de valores próximos a 0,96 para aproximadamente 0,88. Essa redução inibe fortemente o desenvolvimento de *Pseudomonas*, que é o principal agente deteriorante da carne fresca (ORDÓÑEZ, 2005). Alimentos fermentados estão entre os mais antigos alimentos processados e há milênios têm formado uma parte tradicional da dieta na maioria dos países. Há

registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios (VILLEN, 2009).

Originalmente, a fermentação destes alimentos só contou com a microbiota autóctone, no entanto nos últimos 100 anos tem-se utilizado a inoculação de micro-organismos conhecidos como culturas iniciadoras para produção de alguns queijos e embutidos cárneos (ESSID et al., 2007). Hoje, a fermentação continua sendo um dos principais setores da indústria de processamento de alimentos, sendo exemplos produtos de panificação, bebidas alcoólicas, iogurtes, queijos, salames, produtos à base de soja, entre muitos outros (BARROS e BARROS, 2010).

3.2. Culturas iniciadoras em embutidos cárneos fermentados

A fermentação de embutidos cárneos pode ocorrer naturalmente ou por meio da adição de culturas iniciadoras, também conhecidas como culturas *starters*. Nos processos mais tradicionais e artesanais onde não são adicionadas culturas iniciadoras, os micro-organismos responsáveis pela fermentação estão presentes na própria carne ou são provenientes dos equipamentos e utensílios utilizados no processo (MAURIELLO et al., 2004). Nesse tipo de fermentação não é possível garantir que as estirpes de micro-organismos sejam as mesmas, podendo ocorrer variação do perfil enzimático e, por consequência, acarretar na falta de padronização dos produtos (MARTÍN et al., 2007).

A necessidade de fabricar alimentos com boas propriedades tecnológicas, padronizados e que apresentem segurança microbiológica e toxicológica resultou na utilização de culturas iniciadoras. Culturas iniciadoras são compostas por micro-organismos conhecidos, previamente caracterizados e que apresentem atividade metabólica desejada (LEROY e DE VUYST, 2004). Os micro-organismos mais promissores para serem utilizados como culturas iniciadoras são aqueles isolados a partir da microbiota nativa de produtos artesanais/locais. Esses micro-organismos estão bem adaptados às condições ambientais e tecnológicas e por isso são capazes de se desenvolverem de forma mais eficiente e dominar a microbiota presente nos produtos (DROSINOS et al., 2005; MUREDDU et al., 2013).

Para a produção de embutidos cárneos fermentados é necessária a utilização de dois grupos de micro-organismos: bactérias ácido lácticas (BAL) e cocos Gram-positivos, catalase positivo (GCC⁺), pertencentes à família Staphylococcaceae

(estafilococos coagulase negativa – ECN) ou família Micrococcaceae (*Kocuria* e *Micrococcus*). As BAL são responsáveis pela redução do pH, tendo em vista que possuem metabolismo estritamente fermentativo, produzindo ácidos orgânicos a partir da oxidação parcial de carboidratos. Além disso, as BAL são competidoras, inibindo o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, seja pela redução do pH, seja pela produção de outros metabólitos como peróxido de hidrogênio, diacetil e substâncias antimicrobianas de origem proteica denominadas bacteriocinas (GAGGIA et al., 2011; NAIDU, BIDLACK e CLEMENS, 1999), enquanto GCC⁺ são os principais responsáveis pelo *flavor* dos embutidos cárneos fermentados.

3.3. Estafilococos coagulase negativa

As espécies de coagulase negativa pertencentes ao gênero *Staphylococcus* estão disseminadas no ambiente, podendo ser isoladas do solo, ar e água (KLOOS e SCHLEIFER, 1986). Além disso, podem estar presentes na pele e em mucosas de animais e humanos estabelecendo relação de simbiose com o hospedeiro (ISHIHARA et al., 2001). Também podem ser encontradas em produtos alimentícios como queijos e embutidos cárneos (BLAIOTTA et al., 2004; SOARES et al., 2011).

Algumas espécies de ECN apresentam importância clínica, pois estão frequentemente relacionados a casos de infecção em humanos como é o caso das espécies: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis* (MACHADO, 2007). Já espécies como *S. equorum*, *S. xylosus* e *S. carnosus* apresentam importância na tecnologia de alimentos. Bockelmann (2002) sugere a participação de *S. equorum* como componente de culturas iniciadoras em alguns queijos. *Staphylococcus xylosus* e *S. carnosus* são utilizados com muita frequência como culturas iniciadoras em embutidos cárneos fermentados (SIMONOVÁ et al., 2006).

O representante mais importante, dentre as espécies de importância tecnológica, é o *S. xylosus* em virtude da frequência com que é utilizado em embutidos cárneos, em distintos países, e também por ser a espécie mais frequentemente isolada a partir de produtos cárneos fermentados (GARCÍA-VARONA et al., 2000).

Staphylococcus xylosus apresenta morfologia de cocos Gram-positivos de 0.8 a 1.2 μm de diâmetro, que formam colônias de 5 a 10 mm de diâmetro. Conseguem se desenvolver em uma faixa de temperatura entre 25 a 35°C, em concentração de até 15% de NaCl e pH superior a 5,0 (ESSID et al., 2007; FIORENTINI et al., 2009). Algumas cepas de *S. xylosus* podem produzir ácido a partir da glicose, sacarose, maltose, lactose, xilose, frutose (GARCÍA-VARONA et al., 2000).

Esse micro-organismo apresenta atividade metabólica muito desejável para fabricação de salames, uma vez que apresenta produção de catalase, superóxido dismutase, capacidade de reduzir nitratos a nitritos. Além disso, apresenta como característica importante à produção de lipases e proteases que estão relacionadas ao *flavor* do produto final (TALON et al., 1999; BARRIÈRE et al., 2001; SIMONOVÁ et al., 2006). Gardini et al. (2002) destacam ainda que *S. xylosus* tem como característica não formar aminas biogênicas em alimentos, por não apresentar enzimas descarboxilases.

3.4. Propriedades tecnológicas

O grupo ECN destaca-se pela importância tecnológica devido a capacidade de formação e estabilização da cor, decomposição de peróxidos e atribuição do *flavor* característico de embutidos cárneos fermentados.

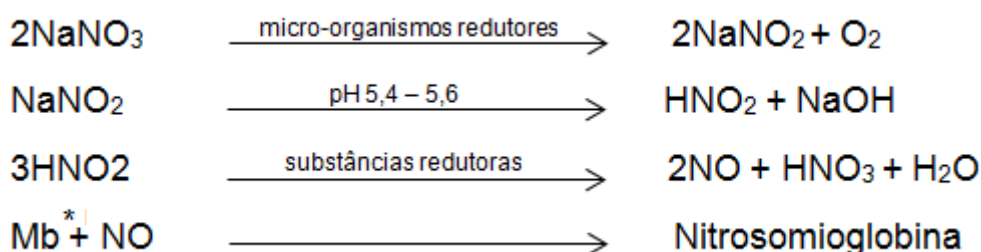
3.4.1. Tolerância à presença de nitrito de sódio (NaNO_2), pH ácido, concentração de NaCl e diferentes temperaturas

A caracterização dos isolados de ECN é importante, pois permite obter informações a respeito de diversos fatores (intrínsecos e extrínsecos) ao alimento que podem influenciar no desenvolvimento das culturas (GØTTERUP et al., 2007). A tolerância de ECN em meios ácidos é necessária, pois embutidos cárneos necessitam ter uma redução no pH já nas primeiras horas de fermentação para inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas. Assim, os ECN devem permanecer viáveis para que possam contribuir com as características organolépticas do alimento (GARCÍA-VARONA et al., 2000). A presença dos sais de cura não podem afetar negativamente as culturas iniciadoras. A literatura tem demonstrado que o gênero *Staphylococcus* resiste a concentrações de até 15% de NaCl e a 150 mg.kg^{-1}

de NaNO_2 e desenvolve-se em temperaturas entre 15 e 40°C, bem como em pH superiores a 5,0 (ESSID et al., 2007; FIORENTINI et al., 2009; BONOMO et al., 2009).

3.4.2. Atividade nitrato redutase

A elaboração de produtos cárneos fermentados requer a adição dos sais de cura, pois possuem atividade antimicrobiana contra algumas bactérias patogênicas, auxiliam na prevenção da rancidez lipídica, atribuem coloração vermelha característica ao produto e influenciam no aroma e sabor (PINTO et al., 2001). Os nitratos e nitritos de sódio ou potássio são utilizados para essa finalidade, no entanto apenas a adição de nitratos não possui efeito, necessitando de micro-organismos que possam reduzir esses nitratos a nitritos. Várias espécies de ECN tem apresentado essa característica, mas principalmente *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. epidermidis*, *S. equorum* (MAURIELLO et al., 2004). Assim, os nitratos são reduzidos a nitritos por ação bacteriana, e em ambiente ácido formam ácido nitroso que se reduz a óxido nítrico, conforme representado na figura 1, as reações químicas.



* Mb: mioglobina

Figura 1. Reações químicas que ocorrem a partir do nitrato de sódio até a formação de nitrosomioglobina.

Fonte: Valsechi, 2001

Para que ocorra a coloração típica em produtos cárneos é necessária a produção de óxido nítrico (NO), derivado dos sais de cura adicionados à massa cárnea. O NO reage com a mioglobina formando a nitrosomioglobina, composto que fornece a cor característica de produtos cárneos curados (ORDÓÑEZ et al., 2005). Além disso, se pode citar a diminuição da oxidação lipídica realizada pela ação dos nitritos por mecanismos indiretos que podem operar simultaneamente: ligação ao grupo heme e prevenção da liberação de ferro catalítico; ligação ao ferro não heme

com inibição da catalase e estabilização dos lipídeos oleofínicos contra a oxidação (TALON et al., 1999).

Podem acontecer também reações que não são desejáveis como a formação de nitrosaminas, que são compostos carcinogênicos. Isso ocorre quando, o nitrito, presente na composição do sal de cura e/ou o nitrato que foi reduzido a nitrito pelos micro-organismos nitrato redutores, é convertido em ácido nitroso, o qual é precursor do anidrido nitroso (principal agente nitrosante em alimentos). Esse agente nitrosante pode reagir com aminas e aminoácidos da carne, produzindo, então, as nitrosaminas. Esse processo de nitrosação é favorecido em pH ácido, geralmente com o pH ótimo entre 2 e 4, dependendo do substrato (DUTRA et al., 2007). Existem algumas formas de evitar esse tipo de reação indesejável que será melhor explicado no item 3.6.1 que trata sobre a formação de aminas biogênicas.

3.4.3. Catalase e superóxido dismutase

No processo de produção de embutidos cárneos fermentados pode ocorrer a formação de peróxido de hidrogênio a partir do metabolismo das BAL. Esse composto pode interferir nas características sensoriais dos produtos cárneos, causando descoloração e oxidação lipídica (LEROY et al., 2006). Além disso, exposição à luz, ao calor e presença de pró-oxidantes são fatores determinantes para a oxidação dos lipídios em alimentos cárneos (FRANKEL et al., 1994).

A enzima catalase produzida por estafilococos atua na decomposição do peróxido de hidrogênio, impedindo a formação de hidroperóxidos, assim também contribui na prevenção da oxidação lipídica (BARRIÈRE et al., 2001).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima muito importante para vários micro-organismos e células vegetais que sejam expostos ao oxigênio. Essa enzima tem a capacidade de reduzir os radicais livres gerados, por exemplo, no processo de respiração celular, pois catalisa a dismutação de radicais superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio (ZIMMERMANN et al., 1973). A SOD é uma enzima que possui um potencial para uso como antioxidante natural em alimentos, sendo patenteada em 1975 (MICHELSON & MONOD, 1975). Vários métodos diretos e indiretos podem ser utilizados para determinação da atividade superóxido dismutase. No entanto, métodos diretos são escassos, pois demandam por

equipamentos como o espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica, que detecta espécies contendo elétrons desemparelhados, ou seja, espécies paramagnéticas (CHENG et al., 2015). Métodos indiretos dependem da capacidade da SOD em inibir radicais superóxidos (espécie reativa do oxigênio). Essas reações indiretas estão mais aplicadas à bioquímica laboratorial (DONNELLY et al., 1989). Beyer e Fridovich, (1987) estudaram o efeito de dois métodos indiretos, redução do citocromo C e do NBT. Os autores explicam que o método NBT é simples e foi preferido para quantificação da atividade superóxido dismutase em extratos brutos.

É desejável que cepas de ECN utilizadas na produção de embutidos cárneos fermentados possuam as atividades catalase e superóxido dismutase, já que se tratam de metabólitos naturais com capacidade antioxidante (MAURIELLO et al., 2004).

3.4.4. Atividade proteolítica e lipolítica

O *flavor* de um produto cárneo fermentado é o resultado da adição de especiarias, produção de ácidos orgânicos (metabólitos de micro-organismos), hidrólise de proteínas e lipídeos por meio de ação enzimática (STAHNKE, 1994).

A produção de lipases e proteases pelos micro-organismos adicionados na massa cárnea, principalmente aqueles que pertencem ao grupo ECN são importantes para formação do *flavor* característico do produto. Esse fato ocorre pela hidrólise de proteínas e lipídeos que resulta na formação de compostos de baixo peso molecular como peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas, ácidos graxos livres (MAURIELLO et al., 2004; SIMONOVÀ et al., 2006). Importante salientar que na carne existem proteases e lipases endógenas que funcionam de forma análoga as enzimas provenientes dos micro-organismos (ZANARDI, GHIDINI, BATTAGLIA, CHIZZOLINI, 2004).

Considerando que embutidos cárneos são alimentos que contém elevado teor de lipídeos, as reações de lipólise tornam-se muito importantes. A ação de lipases ocorrem durante a fermentação e maturação e promovem a liberação de ácidos graxos livres a partir de triglicerídeos e fosfolipídios. Os ácidos graxos livres desempenham um papel importante no sabor típico de embutidos cárneos, pois são

precursores de ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas e dos álcoois, que contribuem consideravelmente para o perfil sensorial final dos embutidos (SAMELIS et al., 1998)

A atividade proteolítica é definida como sendo um conjunto de atividades enzimáticas relacionadas com a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. As proteases dividem-se em duas classes fundamentais de acordo com as zonas onde atuam, sendo elas: as endopeptidases e as exopeptidases. Estas enzimas atuam de forma sequencial durante a fabricação de embutidos cárneos. Primeiramente há atuação de endopeptidases com libertação de peptídeos, estes por sua vez, sofrem a ação de exopeptidases, particularmente as aminopeptidases, responsáveis pela libertação de aminoácidos nos produtos cárneos (FLORES, MARINA e TOLDRÁ, 2000). Do ponto de vista tecnológico, estes acontecimentos são importantes na produção de compostos aromáticos, que contribuem para a melhoria das propriedades sensoriais do produto final.

Berdagué et al. (1993) mostraram que embutidos produzidos com diferentes culturas iniciadoras, pertencentes à família Micrococcaceae e Staphylococcaceae, tiveram diferentes padrões aromáticos, indicando que eles resultariam em embutidos com diferente perfil sensorial. Sendo assim, é necessário escolher isolados de ECN de acordo com o seu perfil enzimático, pois como se percebe, a atividade enzimática, em especial lipases e proteases, refletem diretamente nas propriedades sensoriais do produto final.

3.5. Segurança microbiológica

3.5.1. Atividade antagonista contra bactérias deteriorantes e patogênicas

A competição entre micro-organismos ocorre naturalmente, onde alguns conseguem prevalecer em função da sua produção de metabólitos antimicrobianos. As bactérias ácido lácticas (BAL) e ECN conseguem inibir várias bactérias patogênicas, pela produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e pela produção de pequenos peptídeos denominados bacteriocinas (GAGGIA et al., 2011; HOLZAPFEL, 2002). O principal efeito antimicrobiano das culturas iniciadoras na fermentação é a acidificação dos embutidos cárneos, somado à redução da atividade de água e a exclusão competitiva contribuem para a eliminação da microbiota patogênica (SIMONOVÁ et al., 2006).

A maioria dos trabalhos científicos publicados têm demonstrado que estafilocos isolados de produtos cárneos não apresenta atividade antagonista *in vitro*, bem como não é capaz de produzir bacteriocinas (BONOMO et al., 2009; FIORENTINI, SAWITZKI, BERTOL e SANT'ANNA, 2009; RUARO et al., 2013). Não obstante, Villani et al. (1997) descreveram a atividade inibitória de substâncias antagonistas produzidas por *S. xylosus* contra *L. monocytogenes* e outras bactérias Gram-positivas. A atividade inibitória causada pela produção de bacteriocinas produzidas por estafilococos podem fornecer controle adicional contra patógenos em embutidos cárneos (SIMONOVÁ et al., 2006).

3.5.2. Resistência à antimicrobianos

A utilização de antimicrobianos para tratar casos de infecções em humanos e animais seja pelo uso terapêutico ou profilático, promove uma pressão seletiva, causando a morte de micro-organismos sensíveis e manutenção das cepas resistentes. Esse fato tem contribuído para o aparecimento de micro-organismos resistentes, principalmente em ambientes de uso recorrente como hospitais (CHARPENTIER e COURVALIN, 1999; LEVY e MARSHALL, 2004; MOELLERING, 1990).

A resistência a antimicrobianos pode ser natural ou adquirida (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). A resistência natural é quando todos os micro-organismos de uma espécie apresentam resistência a um determinado antibiótico. A resistência adquirida ocorre quando algumas cepas da mesma espécie se tornam resistentes. A resistência adquirida normalmente ocorre pela transferência horizontal de genes como plasmídeos (figura 2), transposons e bacteriófagos (LEVY, 2002)



Figura 2. Transferência de plasmídeo por conjugação

Fonte: Infoescola <<http://www.infoescola.com/reino-monera/desenvolvimento-e-reproducao-das-bacterias>>

Micro-organismos que possuem genes de resistência transmissíveis configuram um risco à saúde pública, pois podem disseminar genes de resistência para outros grupos taxonômicos e ecológicos (LEVY, MARSHAL, 2004). Chajęcka-Wierzchowska et al. (2015) e Resch, Nagel, Hertel (2008) demonstraram por meio de análises fenotípicas e genotípicas que espécies de ECN tem apresentados genes de resistência a antibióticos. O grupo de ECN podem transmitir genes de resistência para bactérias patogênicas. Neste sentido, é importante avaliar a resistência a antimicrobianos quando se pretende utilizar isolados de ECN como culturas iniciadoras em embutidos cárneos, para garantir maior segurança microbiológica.

3.5.3. Atividade hemolítica e DNase

As hemolisinas são agentes citotóxicos, sendo que sua ação pode auxiliar no poder invasivo da bactéria. Algumas espécies de *Staphylococcus* podem produzir essas hemolisinas. Entre as hemolisinas destacam-se a α -hemolisina e β -hemolisina que diferem entre si de acordo com a ação lítica que causam nos eritrócitos (BUTT et al., 1998). A alfa hemolisina possui capacidade de lisar hemácias e atuar na membrana celular de leucócitos, promovendo o extravasamento do conteúdo da célula e morte celular. A alfa toxina está sobre controle do gene regulador *agr* e é produzida durante a fase pós-exponencial do crescimento bacteriano (BHAKDI e TRANUM-JENSEN, 1991). A beta hemolisina é uma proteína que atua na membrana citoplasmática. Os poros formados na membrana tornam a célula instável e permitem o extravasamento do conteúdo celular. Uma das funções desta hemolisina é a obtenção de ferro. A beta hemolisina também é formada na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano (HUSEBY et al., 2007). Não é possível estimar o quanto é arriscado para a saúde do consumidor ingerir alimentos que contenham micro-organismos com atividade hemolítica, no entanto, a atividade hemolítica é considerada um marcador de virulência e, portanto, sua ausência tem sido utilizada como um dos critérios de seleção para cepas de enterococos e outras culturas que sejam adicionadas aos alimentos (FRANZ, HOLZAPFEL e STILES, 1999).

A detecção da atividade DNase serve para verificar a hidrólise de ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos que compõe o DNA (ÇITAK, VARLIK e

GÜNDOĞAN, 2003). Essa atividade também é considerada um marcador de virulência, sendo que a DNase é tão importante quanto a coagulase para o estabelecimento da infecção e sua detecção distingue estafilococos patogênicos de não patogênicos (GÜNDOĞAN, CITAK e TURAN, 2006).

3.6. Segurança toxicológica

3.6.1. Formação de aminas biogênicas

Aminas biogênicas (AB) são compostos de baixo peso molecular, resultantes da descarboxilação de aminoácidos (BOVER-CID et al., 2001). Esses compostos normalmente não apresentam toxicidade, porém quando ingeridos em elevadas concentrações e combinado com a ingestão de álcool, doenças gastrointestinais, falta de capacidade de desintoxicação por problemas genéticos podem provocar náuseas, diarreias, dilatação de vasos sanguíneos (BOVER-CID et al., 2001; EFSA, 2011).

O processo de descarboxilação dos aminoácidos livres pode ocorrer por duas vias bioquímicas: através de enzimas descarboxilase endógenas naturalmente presentes nos alimentos ou através de enzimas descarboxilase exógenas produzidas por micro-organismos presentes nos alimentos. No entanto, a produção endógena de aminas é insignificante quando comparada com a via exógena (SANTOS, 1996). A produção exógena desses compostos nitrogenados pode ser atribuída a diversos tipos de micro-organismos, entre eles: *Pseudomonas* spp., enterobactérias, bactérias ácido lácticas, estafilococos (VIDAL-CAROU et al., 2007).

Normalmente, as aminas biogênicas estão ausentes ou encontram-se em concentrações mínimas (< 10 ppm) em alimentos frescos; contudo em alimentos como pescado, produtos de pesca, queijos, carnes, ovos e alimentos fermentados podem estar presentes em concentrações significativas (> 50 ppm), capazes de induzir a uma intoxicação alimentar (SHALABY, 1996). As principais aminas encontradas em alimentos são as histaminas, tiramina, putrescina, cadaverina, espermina, triptamina, feniletilamina e espermidina. Já em produtos cárneos fermentados destacam-se a presença de histamina, tiramina, cadaverina, putrescina (SUZZI e GARDINI, 2003). A histamina e tiramina tem sido as ABs mais estudadas por seus efeitos toxicológicos, sendo consideradas as aminas de origem bacteriana

mais importantes em alimentos (BOVER-CID e HOLZAPFEL, 1999). A histamina é considerada a amina mais tóxica exercendo seu efeito por intermédio de três tipos de receptores (H_1 , H_2 e H_3) presentes nas membranas celulares. Atua na dilatação do sistema vascular que resulta em hipotensão, vermelhidão e dores de cabeça (LEHANE e OLLEY, 2000). A gravidade dos sintomas pode variar consideravelmente de acordo com a quantidade de histamina ingerida e a sensibilidade do indivíduo. Sendo que, em casos extremos pode provocar choque anafilático, podendo levar à morte (CHEN et al., 2010). Já a tiramina provoca intoxicação que leva a crises hipertensivas, acompanhadas de fortes dores de cabeça (ARRIETA e PRATS-MOYA, 2012). Martín et al. (2006) avaliaram o potencial 35 isolados de GCC^+ quanto a capacidade de formar aminas e observaram que (14,6%) foram capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos, embora em diferentes intensidades. Constataram que a tiramina foi a AB que se formou em maiores concentrações.

Dentre os alimentos que a literatura demonstra como possíveis de conter aminas biogênicas, seja pela via enzimática endógena ou exógena, merecem destaque os produtos cárneos fermentados. Essa formação de aminas em embutidos cárneos não é desejável, pois pode ocorrer a formação de nitrosaminas conforme relatado no item 3.4.2. Para controlar esse processo de formação de nitrosaminas é recomendável: (1) utilizar culturas iniciadoras que não sejam capazes de descarboxilar aminoácidos (TALON e LEROY, 2011; BUCKENHÜSKES, 1993), (2) utilizar culturas iniciadoras com atividade amino oxidase (MARTUSCELLI et al., 2000), (3) monitorar o pH do salame para que não seja reduzido além do ponto isoelétrico da maioria das proteínas musculares (pH 5,2 - 5,3) (TERRA, 2004), (4) não adicionar concentrações de sais de cura superiores ao que regulamenta a legislação para embutidos cárneos, (BRASIL, 1998), para que não ocorra acúmulo de ácido nitroso, assim reduzindo a possibilidade de formação de anidrido nitroso.

3.6.2. Degradação de aminas biogênicas

As aminas biogênicas podem ser degradadas por meio da desaminação oxidativa catalisada por aminas oxidases com produção de aldeído, amônia e peróxido de hidrogênio. Essas aminas oxidases podem ser proveniente dos micro-

organismos utilizados como culturas iniciadoras. Devido aos riscos de saúde associados a altas concentrações de AB, alguns estudos têm avaliado o potencial de micro-organismos envolvidos na fermentação de alimentos que possuam atividade de amina oxidase, para evitar ou reduzir a acumulação destes compostos indesejáveis. Histamina oxidase foi encontrada em *S. xylosus* (MARTUSCELLI et al., 2000). Outras aminas oxidases como tiramina oxidase foi verificado em *Micrococcus varians* (LEUSCHNER, HEIDEL e HAMMES, 1998) e *S. xylosus* (MARTUSCELLI et al., 2000).

A atividade amino oxidases deve ser considerada como uma característica importante na seleção de culturas iniciadoras que serão utilizadas na produção de alimentos fermentados (GARDINI et al., 2002; SUZZI e GARDINI, 2003)

3.6.3. Produção de enterotoxinas causadoras de intoxicação alimentar

As enterotoxinas são proteínas simples, de baixo peso molecular, produzidas por alguns micro-organismos em diferentes fases do seu crescimento, mas principalmente durante a fase exponencial (SORIANO, et al., 2002). As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis, permanecendo ativas no alimento, mesmo após o processamento térmico. Além disso, essas enterotoxinas apresentam como características, possuírem elevadas resistências às enzimas proteolíticas, tais como tripsina e pepsina, permitindo que permaneçam ativas no trato gastrointestinal (ATANASSOVA; MEINDL; RING, 2001).

Estima-se que 95% dos surtos de intoxicação alimentar causado por toxinas estafilocócicas são causadas pelas enterotoxinas clássicas EEA, EEB, EEC, EED, EEE (LETERTRE et al., 2003). A literatura tem demonstrado que *Staphylococcus aureus* é o principal patógeno produtor de toxinas causadoras de intoxicação alimentar, não obstante outras espécies de ECP também tem sido consideradas enterotoxigênicas como *S. intermedius* e *S. hyicus* (BLAIOTTA et al., 2004).

A capacidade enterotoxigênicas de ECN tem sido um assunto de controvérsia bem como de várias investigações científicas. Estudos têm demonstrado por meio de análises moleculares que a ocorrência de genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas em ECN isolados de produtos cárneos e lácteos é baixa (BLAIOTTA et al., 2004; EVEN et al., 2010). No entanto, Cunha et al. (2006) isolaram ECN de

vários alimentos e verificaram que as espécies *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, que representaram 20 % do total de seus isolados, possuíam o gene *sec* e *sea* com prevalência do gene *sea*. Le Loir, Baron, Gautier (2003) descrevem que as espécies *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* (ambos coagulase negativa) isolados de leite ovino como portadoras de um ou mais genes codificantes para enterotoxinas.

A detecção de genes da classe SE deve ser considerada para todas as estirpes de estafilococos, especialmente quando elas são selecionadas para posterior utilização como culturas iniciadoras (RODRIGUEZ et al.,1996).

4. Material e Métodos

4.1. Amostras

Foram realizadas duas coletas (abril de 2014 e janeiro de 2015) dos seguintes queijos: colonial, quartiolo, parmesão e sbrinz, totalizando oito amostras, todas provenientes da região Sudoeste do Rio Grande do Sul. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, em condições isotérmicas.

4.2. Isolamento

Em cada amostra avaliada, uma alíquota de 25 g foi homogeneizada em 225 mL de água peptonada (AP) 0,1% (Oxoid®). Após, foram realizadas diluições decimais seriadas e inoculações de 0,1 mL foram realizadas em ágar *Brain-Heart Infusion* (BHI) (Acumedia®) modificado, conforme descrição a seguir. Foram realizadas (3) três formulações diferentes, a partir de ágar BHI, utilizando 9% de NaCl (Synth®), 150 mg.kg⁻¹ de NaNO₂ (Vetec®) e adição de ácido láctico (Synth®) para obtenção de pH 4,5. As placas foram incubadas em condições de aerobiose por 48 h a 37 °C. Foram selecionadas colônias, de forma aleatória, a partir dos meios modificados. Após, todos os isolados foram purificados, por esgotamento em estrias, em placas contendo ágar BHI e armazenados a - 80 °C em *eppendorfs* contendo caldo BHI suplementado com 20% (v/v) glicerol.

4.3. Caracterização e identificação fenotípica

Os isolados obtidos foram submetidos à coloração de Gram e catalase. Isolados Gram positivos, apresentando morfologia de cocos e catalase positiva foram selecionados para realização do teste de coagulase conforme *American Public Health Association* (APHA) (2001). Em seguida, foram selecionados vinte (20) isolados de ECN para caracterização e identificação bioquímica através do sistema

Vitek® 2 (BioMérieux, França). Foram utilizados cartões GP Test Kit VTK 2 (Gram-positivos) e o preparo do inóculo, incubação, leitura e interpretação dos resultados seguiram conforme instruções do fabricante.



Figura 3. Equipamento Vitek ®2 e cartões para identificação de bactérias Gram-positivas
Fonte: <<http://www.biomerieux.com.br>>

4.4. Identificação molecular

Todos isolados identificados bioquimicamente como *S. xylosus* foram avaliados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação de gênero e espécie. A extração de DNA ocorreu conforme Matthews et al.(1997).

4.4.1. Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

A confirmação do gênero *Staphylococcus* foi realizada conforme Baron et al. (2004), utilizando os *primers forward* 5' GGACGGGTGAGTAACACGTGG 3' e *reverse* 5' TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT 3' que amplificam um produto de 252 pb. Foram utilizados como controles positivos *S. aureus* ATCC 25923 e *S. xylosus* ATCC 29971. A reação foi preparada contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 1 µL de cada *primer* a 10 pmol, 2 µL de DNA (50ng), e 8,5 µL de água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. A amostra foi amplificada em termociclador (MJ Research PTC 100) a 94 °C por 4 min, para a desnaturação inicial do DNA e, posteriormente, amplificada por 32 ciclos, onde cada ciclo consistiu em: 2 min a 95 °C (desnaturação), 2 min a 52,7 °C (anelamento), 2 min a 72 °C (extensão) e, por fim, extensão final por 7 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese a 80V por 70 min em gel de agarose 1,5% em

tampão TBE (solução de Tris, ácido bórico e EDTA) 0,5X, utilizando-se o marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen®). O produto amplificado foi corado com GelRed™ e visualizado sob luz UV em transiluminador (Loccus®, L-Pix Touch).

O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA, Porto Alegre, Brasil). Posteriormente, foi utilizado o programa *ContigExpress* (pacote *VectorNTI* da *Invitrogen*) para analisar o fragmento sequenciado. Após utilizou-se a ferramenta BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para comparar o resultado do sequenciamento com as demais sequências depositadas.

4.4.2. Identificação de *Staphylococcus xylosus*

A confirmação da espécie *S. xylosus* foi realizada conforme descrito por Morot-Bizot et al., (2003) onde foram utilizados os *primers* XYLF 5'-AACGCGCAACGTGATAAAATTAATG- 3' e XYLR 5' AACGCGCAACAGCAATTACG – 3' que amplificam um produto de 539 pb. Foram utilizados como controle positivo *S. xylosus* ATCC 29971 e como controle negativo *S. aureus* ATCC 25923. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA extraído (50ng), 1µL de cada *primer* a 10 pmol, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.) e 8,5 µL de água ultrapura. A amostra foi amplificada em termociclador MJ Research PTC 100 nas seguintes condições: 5 min a 94°C para desnaturação do DNA seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94 °C (desnaturação), 30 seg a 57 °C (anelamento) e 45 seg a 72 °C (extensão) e uma extensão final de 6 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose seguido de visualização em transiluminador nas mesmas condições já descritas anteriormente

4.5. Determinação das propriedades tecnológicas

4.5.1. Tolerância ao cloreto de sódio, pH, temperatura e simulação *in vitro* de um produto cárneo fermentado

A capacidade de multiplicação *in vitro* em diferentes condições foi determinada conforme Fiorentini et al. (2009)a e Mauriello et al. (2004), com adaptações. Para isto,

primeiramente, foi inoculado em caldo BHI uma alçada de cultura estoque seguida de incubação por 18 horas a 37 °C. Após, foi transferido 0,1 mL do cultivo para tubos de ensaio e verificado a capacidade dos isolados em multiplicarem-se sob diferentes temperaturas (4 e 42 °C) em caldo BHI. Além disso, foi avaliado o efeito do cloreto de sódio (NaCl) a 9 e 15%, adicionado ao caldo BHI. A tolerância ao pH ácido (4,5 e 5,0) foi realizada em caldo BHI ajustado com ácido clorídrico (HCl) (0,1N). Para ambos os testes foi utilizado temperatura de incubação a 25 °C. Para simulação de um produto cárneo fermentado no início do processo de fermentação foi utilizado NaCl a 2,8%, pH 5,8, nitrito de sódio (NaNO₂) a 100 mg.kg⁻¹ e incubação a 25 °C. Realizou-se contagem em placas contendo ágar BHI nos tempos 0 e 72h para todas as análises. Os resultados foram expressos em Log UFC.mL⁻¹ e submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey (≤ 0.05) utilizando o software STATISTICA versão 6.1 (StatSoft, França).

4.5.2. Atividade proteolítica e lipolítica

Atividade lipolítica foi testada conforme Kouker e Jaeger (1987). Inicialmente, preparou-se o meio contendo 0,8% de caldo nutriente (BBL) (Oxoid®), 0,4% de NaCl e 1% de ágar-ágar (Vetec®) e após processo de autoclavagem (121 °C/15 min) o meio foi resfriado até 60 °C. Em seguida, adicionou-se 2,5% de azeite de oliva extra virgem e homogeneizou-se em ultraturrax a 5.000 rpm por 3 min para uma adequada emulsão. Após, adicionou-se 1% de Rodamina R (1mg/mL) (Synth®), sendo o meio vertido em placas de petri. O cultivo *overnight* foi centrifugado (13.000 g por 5 min) e o *pellet* ressuspensionado em PBS. Dez microlitros da suspensão celular foi adicionado em três pontos do ágar seguido de incubação a 37 °C por 48 h. O aparecimento de halos fluorescentes sob luz UV a 350 nm indica atividade lipolítica.

Para determinação da atividade proteolítica, procedeu-se de acordo com Mauriello et al. (2004) com adaptações. Primeiramente, realizou-se o preparo do ágar contendo 0,5% de triptona de soja, 0,25% de extrato de levedura, 0,1% de glicose e 1,5% de ágar-ágar. Após autoclavagem (121 °C/15 min), o meio foi resfriado a 60 °C seguido de adição de 0,57 mg/mL de proteína *Bovine Serum Albumin* (Sigma®) e plaqueamento. Dez microlitros da suspensão celular preparada conforme descrição anterior foi inoculado ao meio, seguido de incubação a 37 °C por

48 h. Após este período, o ágar foi removido das placas de petri e corados por 5 min com solução contendo 0,05% de corante reativo azul brilhante em metanol: ácido acético: água (50:40:10) e descorado em metanol: ácido acético: água (25:5:70). Zonas claras indicam atividade proteolítica, sendo os resultados expressos em mm. Para ambas as análises se utilizou como controle positivo a cepa *S. xylosus* ATCC 29971.

4.5.3. Atividade nitrato redutase

A atividade nitrato redutase foi determinada conforme Miralles et al. (1996), com adaptações. As culturas foram incubadas por 24 h a 37 °C em *Tryptic Soy Broth* (TSB). Em seguida, foram adicionados 10 µL da suspensão celular (obtido da mesma forma que no item 4.5.2.) sobre o ágar contendo 0,8% de triptona de soja, 0,5% extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 1% de nitrato de sódio (NaNO₃) e 0,7% de ágar-ágar. As placas foram incubadas a 15, 25 e 37 °C por 24 h. Como controle positivo foi utilizado a cepa *S. xylosus* ATCC 29971 e como controle negativo *L. plantarum* ATCC 8014. Após o período de incubação, as placas foram encharcadas com 1 mL de NIT1 (0,8% de ácido sulfanílico em ácido acético 5N) e 1 mL de NIT2 (0,6% N-N-dimetil-1-naftilamina em ácido acético a 5N). A aparência de coloração vermelha-violeta ao redor das colônias indica atividade nitrato redutase.

4.5.4. Atividade superóxido dismutase

A atividade superóxido dismutase (SOD) foi avaliada conforme Mauriello et al. (2004) e Cheng et al. (2015), com adaptações. Inicialmente, realizou-se o cultivo *overnight* a 37 °C, sendo 2 mL desse cultivo centrifugado a 13.000 *g* por 5 minutos, e o *pellet* foi lavado uma vez utilizando K₂HPO₄ a 50 mM. Para extração da superóxido dismutase, adicionou-se 1 mL de K₂HPO₄ a 50 mM e 1/3 do volume de pérolas de vidro (0,1 mm), agitou-se por 5 min em Vortex (Vixar), para ocorrer a lise celular. Posteriormente, realizou-se nova centrifugação a 13.000 *g* por 5 minutos para obter o sobrenadante contendo a superóxido dismutase. Para avaliar a atividade da enzima, adicionou-se 20 µL do sobrenadante, 200 µL NBT a 150 µM, 200 µL de metionina a 10 mM, 400 µL de riboflavina a 1,2 µM e 1.980 µL de K₂HPO₄

a 50 mM em tubos de ensaio. O controle foi realizado com as mesmas condições descritas acima, porém sem a adição do sobrenadante, sendo os 20 µL completados com K₂HPO₄ a 50 mM. Após, a amostra e o controle foram expostos a luz fluorescente (30 W), a uma distância de 50 cm em temperatura ambiente por 30 min. Em etapa posterior, foi utilizado espectrofotômetro (Jenway) para verificar a absorbância a 560 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%), obtidos pela seguinte equação: Atividade SOD = (1-a/c) x 100, onde *a* é igual a DO do controle e *c* igual a DO da amostra. Para a realização dessas análises foi utilizado como controle positivo o isolado *S. xylosus* AD1 pertencente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/UFPel.

4.6. Segurança microbiológica e toxicológica

4.6.1. Avaliação da resistência fenotípica e genotípica a antimicrobianos

A avaliação fenotípica da resistência aos antimicrobianos foi realizada pelo método de disco difusão em ágar, utilizando-se ágar Mueller-Hinton - MH (Merck). Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: ampicilina (10 µg), penicilina G (10 U), amoxicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), rifampicina (5 µg) e sulfametoxazol trimetoprima (1.25/23.75 µg) adquiridos pela Laborclin[®]. Como controle das análises, foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos foi verificada conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). As análises genotípicas foram avaliadas através da técnica de PCR para as seguintes classes e seus respectivos genes: β-Lactâmicos (*blaZ*), inibidores da síntese de folato (*sul1*, *sul2*, *dfrG*), macrolídeos (*ermB*, *ermC*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *Tn916-1545*), e aminoglicosídeos (*strA*, *strB*), de acordo com os autores dos *primers* descritos na tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos e cepas utilizadas para detecção de genes de resistência a antimicrobianos

Classe do antimicrobiano	Gene alvo	Sequência de <i>primers</i> 5' - 3'	Cepas usadas na PCR como controle positivo	Tamanho do Amplicon (pb)	Referências
β-Lactâmicos	<i>blaZ</i>	fw: ACTTCAACACCTGCTGCTTTC rv: TGACCACTTTTATCAGCAACC	<i>Staphylococcus aureus</i> S10	172	Martineau et al., (2000)
	<i>sul1</i>	fw: ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTG rv: CTAGGCATGATCTAACCCTCGGTCT	<i>Salmonella</i> Typhimurium 22C	840	Grape et al., (2003)
Inibidores da síntese de folato	<i>sul2</i>	fw: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT rv: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	<i>Salmonella</i> Typhimurium 171B2	293	Kern et al., (2002)
	<i>dfrG</i>	fw: TTTCTTTGATTGCTGCGATG rv: CCCTTTTGGGCAAATACCT	<i>Staphylococcus aureus</i> S10	422	Bertsch et al., (2013)
Macrolídeos	<i>ermB</i>	fw: CATTTAACGACGAAACTGGC rv: GGAACATCTGTGGTATGGCG	<i>Staphylococcus aureus</i> 218	424	Jensen, (1999)
	<i>ermC</i>	fw: AATCGTCAATTCCTGCATGT rv: TAATCGTGGAATACGGGTTTG	<i>Staphylococcus aureus</i> S10	299	Strommenger et al., (2003)
	<i>tetA</i>	fw: GTAATTCTGAGCACTGT rv: CCTGGACAACATTGCTT	<i>Salmonella</i> Typhimurium 22C	953	Frech and Schwarz, (2000)
	<i>tetB</i>	fw: ACGTTACTCGATGCCAT rv: AGCACTTGTCTCCTGTT	<i>Salmonella</i> Typhimurium 171B2	1169	Frech and Schwarz (2000)
Tetraciclínas	<i>tetK</i>	fw: GTAGCGACAATAGGTAATAGT rv: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	<i>Staphylococcus aureus</i> S2	360	Strommenger et al. (2003)
	<i>tetL</i>	fw: CAAACTGGGTGAACACTG rv: CCTGTTCCCTCTGATAAA	<i>Staphylococcus aureus</i> S2	1028	Pang et al. (1994)
	<i>tetM</i>	fw: AGTGGAGCGATTACAGAA rv: CATATGTCCTGGCGTGTCTA	<i>Staphylococcus aureus</i> S10	158	Strommenger et al. (2003)
	<i>tetO</i>	fw: AATGAAGATTCCGACAATTT rv: CTCATGCGTTGTAGTATTCCA	<i>Campylobacter jejuni</i> 119	781	Li, Sherwood e Logue, (2007)

(continuação)

Classe do antimicrobiano	Gene alvo	Sequência de <i>primers</i> 5' - 3'	Cepas usadas na PCR como controle positivo	Tamanho do <i>Amplicon</i> (pb)	Referências
Tetraciclinas	Tn916-1545	fw: GCGTGATTGTATCTCACT rv: GACGCTCCTGTTGCTTCT	<i>Staphylococcus aureus</i> S10	1028	Li, Sherwood e Logue, (2007)
	<i>strA</i>	fw: TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG rv: CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA	<i>Salmonella</i> Typhimurium 22C	645	Kehrenberg and Schwarz, (2001)
Aminoglicosídeos	<i>strB</i>	fw: ATCGTCAAGGGATTGAAACC rv: GGATCGTAGAACATATTGGC	<i>Salmonella</i> Typhimurium 140B1	510	Kikuvi et al., (2007)
		rv: CCCTTTTTGGGCAAATACCT			

4.6.2. Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica, foi avaliada de acordo com Ruaro et al. (2013), com adaptações. Utilizou-se Ágar Triptona de Soja (TSA) suplementado com 7% de sangue equino, com incubação a 37 °C durante 24 h. Atividade positiva para da β -hemólise resulta em uma lise completa dos eritrócitos com aparecimento de um halo claro em torno da colônia, enquanto uma reação α -hemólise envolve a lise parcial dos eritrócitos.

4.6.3. Atividade DNase

A atividade DNase foi determinada conforme *American Public Health Association* - APHA (2001) em ágar DNA azul de Toluidina contendo: Tris (hidroximetil) aminoetano 0,61 g, ágar DNase 0,63 g, solução CaCl_2 (0,01M) 0,1 mL, NaCl 0,935 g, ágar-ágar 0,775 g, solução de azul de toluidina (1%) 0,92 mL. Os reagentes foram fundidos exceto o azul de toluidina, em seguida, o meio foi resfriado a 50 °C, adicionado azul de toluidina e realizado o plaqueamento. Após a solidificação do meio, foi estriada uma alçada do caldo com crescimento do isolado LQ3 e da cepa *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo). As placas foram incubadas em câmara úmida em condições de aerobiose por 24h a 37 °C. O aparecimento de zonas claras em torno do crescimento celular indicou atividade DNase positiva.

4.6.4. Atividade antagonista contra bactérias patogênicas

Utilizou-se a técnica *spot-on-the-lawn* descrita por Schillinger e Lucke, (1989), com adaptações. O meio de cultura utilizado foi o ágar TSA suplementado com 0,6% de extrato de levedura, 0,4% de sacarose e 0,1% de lactose. Após a esterilização do meio em autoclave (121°C/15min), resfriou-se até 50 °C e adicionou-se a concentração de 10^5 a 10^6 UFC/mL das cepas listadas na tabela 3. Após, o meio foi vertido em placas de petri e adicionado sobre o ágar, gotas de 10 μL da suspensão de *S. xylosus* LQ3 e de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (controle positivo). Posteriormente, as

placas foram incubadas em aerobiose por 24h a 37°C. O aparecimento de halos de inibição indica potencial antagonista e o resultado é expresso em mm.

Tabela 2. Micro-organismos patogênicos utilizados para verificação da atividade antagonista por *S. xylosus* LQ3

Classe	Micro-organismos	Origem
Gram-Positivo	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	ATCC ¹
	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	ATCC ¹
	<i>Listeria monocytogenes</i> Siliken	TIAR ³
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	ATCC ¹
	<i>Listeria innocua</i> CLIP 12612	CLIP ²
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC ¹
Gram-negativo	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	ATCC ¹
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	ATCC ¹

¹ ATCC: American Type Culture Collection

² CLIP: Listeria Collection of Institute Pasteur

³ TIAR: Tasmanian Institute of Agricultural Research, University of Tasmania, Australia

4.6.5. Atividade antagonista do sobrenadante livre de células

Para detectar a possível produção de substância antimicrobiana pelo isolado *S. xylosus* LQ3 foi utilizado a técnica *spot-on-the-lawn* descrita por De Martinis e Franco, (1998) com algumas modificações. O isolado foi cultivado em caldo BHI por 18-24 horas a 25°C e 37°C. Após alíquotas de 1 mL provenientes dos caldos foram transferidas para *eppendorfs* e centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e transferidos para outros *eppendorfs* onde foi ajustado o pH para 6,0-7,0 com hidróxido de sódio (NaOH) a 1M com a finalidade de evitar a inibição pelo ácido. Logo após os sobrenadantes foram tratados termicamente por 10 minutos a 80°C em banho-maria para inativação das enzimas extracelulares, H₂O₂ e células residuais. Em seguida, 10 µL de cada um dos sobrenadantes foi inoculado por superfície em ágar BHI contendo *L. monocytogenes* na concentração de 10⁵ a 10⁶ UFC.mL⁻¹. As placas foram incubadas por 24h a 37 °C. A presença de halos inibitórios indica a presença de substâncias antimicrobianas no sobrenadante. Foi utilizado o isolado bacteriocinogênico *Lactobacillus curvatus* P99 proveniente de presunto cozido (Laboratório de Microbiologia de Alimentos/UFPel), como controle positivo.

4.6.6. Detecção de genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas

A detecção dos genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas clássicas SEA, SEB, SEC, SED e SEE foi realizada por PCR, utilizando os *primers* e as condições conforme os autores dos respectivos *primers* listados na tabela 2.

4.6.7. Detecção dos genes histidina e tirosina descarboxilase

A detecção dos genes envolvidos na descarboxilação dos aminoácidos histidina e tirosina foram avaliados por PCR multiplex de acordo com os autores listados na tabela 3 com algumas modificações. A concentração do DNA para todas as amostras foi de 20 ng/μL e concentração de 2 pmol para o primer 16S rDNA (controle interno da reação), 20 pmol para os primer Hdc e Tyrdc. A reação foi preparada contendo 12,5 μL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 1,0 μL de cada primer *forward* e *reverse*, 2 μL do DNA e 4,5 μL de água para completar o volume final de 25 μL. As condições do programa de amplificação foram: 95 °C por 5 min, 32 ciclos de 95 °C por 45 seg, 52°C por 45 seg, 72 °C por 1min e 15 seg e extensão final de 72 °C por 5 min. A eletroforese foi realizada a 100V por 50 min em gel de agarose 1,5% e visualizado em transiluminador da mesma forma já descrita no item 4.4.1.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes envolvidos na produção de enterotoxinas e aminas biogênicas

Função	Genes alvo	Sequência de <i>Primers</i> 5' - 3'	Tamanho do <i>Amplicon</i> (pb)	Referências
Enterotoxina	<i>sea</i>	fw: ACGATCAATTTTACAGC rv: TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	544	Rosec e Gigaud, (2002)
	<i>seb</i>	fw: ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGGA rv: ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	404	Jarraud et al. (2002)
	<i>sec</i>	fw: GACATAAAAGCTAGGAATTT rv: AAATCGGATTAACATTATCCA	257	Rosec e Gigaud (2002)
	<i>sed</i>	fw: CAAATATATTGATATAATGA rv: AGTAAAAAAGAGTAATGCAA	330	Zocche et al. (2009)
	<i>see</i>	fw: CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC rv: CACCTTACCGCCAAAGCTG	482	Jarraud et al. (2002)
	<i>hdc</i>	fw: GATGGTATTGTTTCKTATGA rv: CAAACACCAGCATCTTC	440	Coton e Coton (2005)
Decarboxilase	<i>tyrdc</i>	fw: ACATAGTCAACCATRTTGAA rv: CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	1133	Coton e Coton (2005)

5. Resultados e discussão

5.1. Isolamento, caracterização e Identificação fenotípica

Foram obtidos setenta e três (73) isolados, dos quais 71% (52/73) apresentaram características de ECN. Dos 52 isolados, 20 foram submetidos à análise bioquímica pelo método Vitek® 2. Utilizou-se como critério de seleção dos isolados a sua origem (queijos diferentes) e seu isolamento (meios de cultura distintos) com a finalidade de reduzir a probabilidade de isolar o mesmo micro-organismo. A caracterização bioquímica possibilitou identificar 17 isolados como sendo pertencentes ao grupo ECN. Pode-se observar que houve prevalência de *S. saprophyticus* (82%), sendo também identificado *S. xylosus* (12%) e *S. cohnii* ssp *urealyticus* (6%). Chajęcka-Wierzchowska et al. (2015) isolaram 58 ECN a partir de queijos, carnes curadas, salsichas, peixes defumados e identificaram, através de testes fenotípicos e genotípicos a presença de *S. xylosus* (50%); *S. epidermidis* (28%); *S. lentus* (11%); *S. saprophyticus* (7%); *S. hyicus* (2%) e *S. simulans* (2%).

A espécie prevalente identificada no presente trabalho (*S. saprophyticus*) se trata de uma bactéria comensal presente na pele e na mucosa urogenital de humanos, frequentemente relacionada a casos de infecções urinárias, o que indica possível contaminação pelo manipulador, seja no preparo ou na comercialização do alimento (FERREIRA et al., 2012; ISHIHARA et al., 2001).

Dois isolados, LQ2 e LQ3, provenientes dos queijos parmesão e sbrinz e dos meios modificados com NaCl e NaNO₂, respectivamente, foram identificados fenotipicamente como sendo *S. xylosus*, espécie tecnologicamente importante na produção de embutidos cárneos. Verificou-se que ambos não utilizaram os carboidratos galactose, maltose, ribose, rafinose, sorbitol, trialose, mas utilizaram manitol, manose e sacarose. Os isolados diferem entre si quanto à utilização dos carboidratos xylose e lactose, sendo que o isolado LQ2 utiliza xylose e LQ3 utiliza a lactose. Devido à importância

tecnológica dessa espécie de ECN, esses dois isolados foram selecionados para a sequência do trabalho.

5.2. Identificação de gênero e espécie por técnicas moleculares

É importante destacar que a caracterização fenotípica permite obter informações relevantes sobre as características bioquímicas dos isolados, contudo, para uma identificação precisa em nível de gênero e espécie, é necessário se utilizar técnicas moleculares.

Os isolados LQ2 e LQ3 foram submetidos a técnicas moleculares (PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA) para confirmação de sua identidade, e verificou-se que ambos pertencem ao gênero *Staphylococcus* (Figura 4A), porém, diferem quanto a espécie: o isolado LQ2 pertence à espécie *S. epidermidis*, enquanto o isolado LQ3, à espécie *S. xylosus* (Tabela 4, Figura 4B). *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria comensal da pele e mucosas, sendo um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares (GABRIEL et al., 2015). Dessa forma, o isolado LQ3, por pertencer a uma espécie de ECN (*S. xylosus*) com potencial tecnológico, foi avaliado quanto as suas propriedades tecnológicas, bem como aspectos de segurança microbiológica e toxicológica.

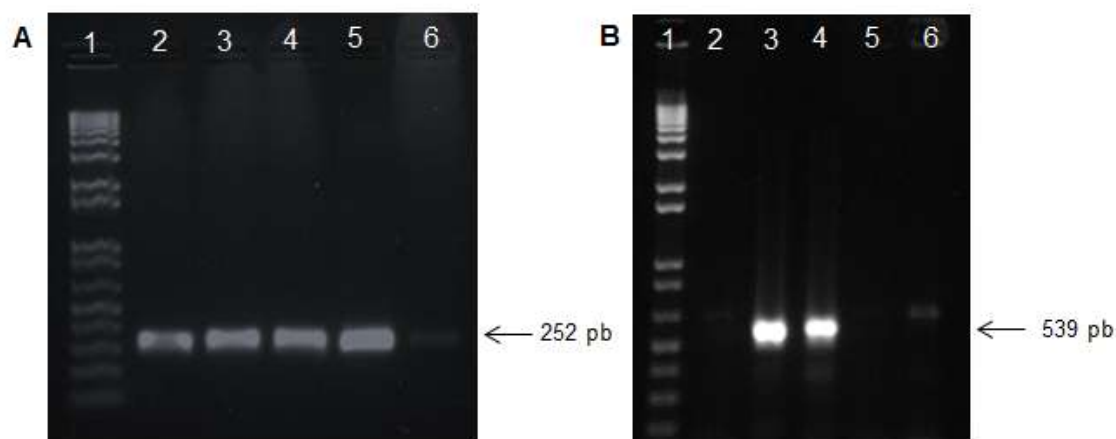


Figura 4. (A) Produtos da amplificação do gene 16S rDNA (252 pb). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb. Canaletas 2: *Staphylococcus xylosus* LQ2 isolado de queijo. Canaleta 3: *Staphylococcus xylosus* LQ3 isolado de queijo. Canaleta 4: *S. xylosus* ATCC 29971. Canaleta 5: *S. aureus* ATCC 19095. Canaleta 6: controle da reação (água esterilizada). (B) Produtos da amplificação do gene espécie específico para *S. xylosus* (539 pb). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb. Canaletas 2: *Staphylococcus xylosus* LQ2 isolado de queijo. Canaleta 3: *Staphylococcus xylosus* LQ3 isolado de queijo. Canaleta 4: *S. xylosus* ATCC 29971. Canaleta 5: *S. aureus* ATCC 19095 (controle negativo). Canaleta 6: controle da reação (água esterilizada).

Tabela 4: ECN identificados por sequenciamento da região 16S rDNA.

Isolado	Identificação por 16S rDNA	Similaridade %
LQ2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
LQ3	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99

5.3. Propriedades tecnológicas

5.3.1. Tolerância ao cloreto de sódio, pH, temperatura e simulação *in vitro* de um produto cárneo fermentado

A avaliação da tolerância do isolado LQ3 a diferentes temperaturas indicou que o isolado se multiplica a 42 °C. Verificou-se aumento de 4,46 Log UFC.mL⁻¹ depois de 72 h de incubação (tabela 5). Temperatura de refrigeração (4 °C) e pH ácido (4,5 e 5,0), demonstraram ser fatores limitantes para o desenvolvimento do isolado LQ3, uma vez que não houve diferença na contagem após 72 h de incubação em comparação com o tempo inicial (tabela 5). O isolado LQ3 se desenvolveu em ambas concentrações de NaCl utilizadas, apresentando contagens de 4,46 Log UFC.mL⁻¹ e 3,28 Log UFC.mL⁻¹ em 9 e 15% de NaCl, respectivamente após 72 h de incubação (tabela 5). Representantes do gênero *Staphylococcus* apresentam como características ser mesofílicos (crescimento 18 a 45 °C), sensíveis ao ácido (pH ótimo entre 6,0 e 7,0) e tolerar concentrações de até 20 % de NaCl (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Pode-se verificar que o comportamento do isolado LQ3 frente às condições testadas, está de acordo com as características apresentadas pelo grupo. Bonomo et al. (2013) verificaram que seus 37 isolados se desenvolveram bem a 20 e 30 °C, bem como notaram desenvolvimento inferior para incubação a 10 °C e pH ácido, variando de 5,2 a 6,0.

O isolado LQ3 também apresentou crescimento para simulação de um embutido cárneo fermentado demonstrando crescimento de 3,36 Log UFC.mL⁻¹ superior ao tempo inicial após 72 h de incubação (tabela 5).

Tabela 5. Tolerância ao cloreto de sódio, pH, temperatura e simulação *in vitro* de um produto cárneo fermentado

Tempo (horas)	Log UFC.mL ⁻¹						
	4°C	42°C	15% NaCl	9% NaCl	pH 4,5	pH 5,0	SPCF*
0	3,76 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a
72	3,91 ^a	8,21 ^b	7,04 ^b	8,22 ^b	2,75 ^a	2,99 ^a	7,12 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

*Simulação produto cárneo fermentado

Vários trabalhos analisam diferentes concentrações de NaCl, NaNO₂, bem como diferentes pH e temperaturas (BONOMO et al., 2009; FIORENTINI et al., 2009a; MAURIELLO et al., 2004). Neste estudo, além de avaliar esses parâmetros isoladamente, procurou-se reuni-los de forma análoga ao que ocorre em um embutido cárneo no início do processo de fermentação. Observou-se que o isolado LQ3 teve crescimento, quando os parâmetros foram avaliados isoladamente e quando esses foram avaliados em conjunto, demonstrando que o isolado LQ3 possui potencial para ser utilizado em embutidos cárneos fermentados.

5.3.2. Atividade proteolítica, lipolítica, nitrato redutase e superóxido dismutase

As atividades lipolítica, proteolítica e nitrato redutase são importantes para as características sensoriais do produto (SIMONOVÁ et al., 2006; TALON et al., 1999).

O isolado LQ3 apresentou atividade lipolítica e proteolítica conforme os métodos utilizados. As atividades proteolíticas e lipolíticas são responsáveis pela formação de compostos de baixo peso molecular, incluindo peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas, ácido graxos livres os quais contribuem para o desenvolvimento do *flavor* dos produtos cárneos fermentados (MAURIELLO et al., 2004). Ruaro et al. (2013) verificaram que dos 7 isolados identificados como *S. xylosus*, nenhum apresentou atividade proteolítica em ágar contendo leite desnatado. Já quando avaliado a atividade lipolítica em ágar tributirina verificaram que 5 dos 7 *S. xylosus* apresentaram atividade. Fiorentini et al. (2009) verificaram que dos 9 isolados de *S. xylosus* testados, todos

apresentaram atividade lipolítica, utilizando o mesmo método realizado em nosso trabalho.

O isolado LQ3 também reduziu nitrato a nitrito a 25 e 35 °C, porém não demonstrou redução a 15 °C. Essa atividade é muito importante considerando que a temperatura de fermentação de embutidos cárneos ocorre em temperaturas próximas a 25 °C. A redução de nitratos por esses micro-organismo proporcionam estabilidade da cor vermelha desejável pela formação da nitrosomioglobina que consiste na ligação de um elétron do óxido nítrico ao íon Fe^{++} do grupo heme da carne (VALSECHI, 2001). Essid et al. (2007) verificaram que, dos 40 isolados identificados como *S. xylosus*, todos foram capazes de reduzir nitrato a nitrito a 25 e 30 °C, não obstante perceberem que 75% dos isolados reduziram nitrato a 18 °C.

Em relação à atividade superóxido dismutase verificou-se que o isolado LQ3 apresentou capacidade antioxidante de $9,43 \pm 1,43\%$ contra uma atividade de $24,42 \pm 3\%$ do isolado AD1 utilizado como controle positivo para essa análise. Em outro estudo, onde também foi utilizado o método NBT (nitroazul de tetrazólio) para determinar a capacidade antioxidante da SOD, verificou-se que todos os 23 isolados avaliados apresentaram esta atividade, variando de 2,0 a 63,2% (MAURIELLO et al., 2004). O método NBT consiste na decomposição da riboflavina quando irradiada por luz ultravioleta ou luz visível (420–560 nm). Esse fato favorece a oxidação da metionina, sendo essa doação de elétrons capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (O_2^-) que possuem a capacidade de reduzir o NBT. Essa redução do nitroazul de tetrazólio causa um aumento na absorbância a 560 nm. A capacidade antioxidante de metabólitos presentes naturalmente em alimentos é um fator desejável. As enzimas catalase e SOD são importantes para reduzir a oxidação lipídica, responsável pelo ranço. A enzima SOD catalisa a dismutação de radicais superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio e oxigênio, já a enzima catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (CHENG et al., 2015; MAURIELLO et al., 2004). Além disso, é importante destacar que no processo de produção de embutidos cárneos fermentados pode ocorrer a formação de peróxido de hidrogênio a partir do metabolismo das BAL, sendo a catalase produzida por ECN essencial para evitar a oxidação lipídica (LEROY, VERLUYTEN e VUYST, 2006).

Tabela 6: Propriedades tecnológicas enzimáticas de *S. xylosus* LQ3

Micro-organismo	Atividade nitrato redutase			Atividade lipolítica	Atividade proteolítica (mm)	Atividade SOD (%)
	15 °C	25 °C	35 °C			
<i>S. xylosus</i> LQ3	-	+	+	+	10.33 ± 0.44	9,43 ± 1,43
<i>S. xylosus</i> ATCC 29971	-	+	+	+	10.00 ± 0.66	n.a
<i>S. xylosus</i> AD1	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	24,42 ± 3

+ presença de atividade

- ausência de atividade

n.a. não avaliado

5.4. Segurança microbiológica e toxicológica

5.4.1. Avaliação fenotípica e genotípica de resistência a antimicrobianos

O isolado LQ3 demonstrou ser sensível a todos os antimicrobianos testados (tabela 7). Além disso, não apresentou nenhum dos genes de resistência avaliados.

Tabela 7. Avaliação da suscetibilidade do isolado *S. xylosus* LQ3 aos antimicrobianos

Micro-organismo	AMP	PEN	AMC	TET	ERI	CIP	EST	GEN	CLO	RIF	SUT
<i>S. xylosus</i> LQ3	36	35	38	33	31	36	30	31	29	37	32
	36	36	37	32	30	35	29	29	30	37	32
Média	36	35,5	37,5	32,5	30,5	35,5	29,5	30	29,5	37	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	33	36	37	30	28	29	21	23	25	31	28
	34	35	37	29	27	29	21	22	26	32	28
Média	33,5	35,5	37	29,5	27,5	29	21	22,5	25,5	32	28

AMP: ampicilina (10 µg), PEN: penicilina G (10 U), AMC: amoxicilina (10 µg), TET: tetraciclina (30 µg), ERI: eritromicina (15 µg), CIP: ciprofloxacina (5 µg), EST: estreptomicina (10 µg), GEN: gentamicina (10 µg), CLO: cloranfenicol (30 µg), RIF: rifampicina (5 µg) e SUT: sulfametoxazol-trimetoprim (1.25/23.75 µg)

Chajęcka-Wierzchowska et al. (2015) detectaram que 51,7% (15/29) dos isolados identificados como *S. xylosus* apresentaram resistência fenotípica a pelo menos um antibiótico testado e que desses isolados, 93% (14/15) apresentaram um ou mais genes de resistência. Em outro estudo realizado na Espanha com ECN isolados de produtos cárneos se verificou que dos 16 *S. carnosus* avaliados fenotipicamente, nenhum apresentou resistência aos antibióticos testados, porém o único *S. xylosus* avaliado demonstrou ser resistente a ampicilina e penicilina, ambos pertencentes da classe dos β-

Lactâmicos (LANDETA et al., 2013). Estudos apontam que ECN podem ser resistentes aos antimicrobianos bem como portadores de genes de resistência e, uma vez estando no alimento ou no intestino humano, podem disseminar genes de resistência via horizontal para outros grupos taxonômicos tornando um risco para saúde pública (LEVY e MARSHALL, 2004). Sendo assim, torna-se indispensável avaliar através de testes fenotípicos e genotípicos a resistência aos antimicrobianos em isolados de ECN que se destinam a aplicação como culturas iniciadoras.

5.4.2. Atividade hemolítica e DNase

Observou-se, neste estudo, que o isolado *S. xylosus* LQ3 não apresentou atividade para hemólise e DNase. Ruaro et al. (2013) testaram isolados pertencentes ao grupo ECN para atividade hemolítica e observaram que 31% (24/77) apresentaram atividade, sendo 17 para β -hemólise e 7 para α -hemólise. Marques et al. (2013) isolaram 250 *Staphylococcus* spp. de leite de vaca e verificaram 145 foram identificados como ECN. Os mesmos autores constataram que a maior expressão fenotípica de fatores de virulência ocorreu em isolados identificados como *S. aureus*. No entanto, verificaram que dos 145 isolados identificados como ECN 9% apresentaram atividade hemolítica e que 26,2% demonstraram atividade DNase. Em trabalho recente pesquisadores isolaram BAL a partir de leite de cabra e verificaram que nenhum isolado apresentou atividade para DNase (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015).

Como se pode perceber vários pesquisadores têm avaliado atividade hemolítica e DNase em isolados que se destinam à aplicação em alimentos como é o caso de BAL e ECN. Sendo assim, é recomendável que isolados que serão aplicados futuramente em alimentos não possuam esses fatores de virulência.

5.4.3. Atividade antagonista contra bactérias patogênicas

O isolado *S. xylosus* não apresentou atividade antagonista contra as bactérias patogênicas testadas. Geralmente, ECN não apresentam essa característica *in vitro* como se pode observar em outros trabalhos. Fiorentini, et

al. (2009b) analisaram a capacidade antagonista de *S. xylosus* (AD1 e U5) contra as cepas patogênicas de *L. monocytogenes* NTC 098630, *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 12598 e verificaram que os isolados não possuíram atividade antagonista. Da mesma forma Ruaro et al. (2013) observaram que nenhum dos 77 isolados pertencente ao grupo ECN foi capaz de inibir *S. aureus*. Porém, alguns ECN são capazes de produzir bacteriocinas que atuam como antimicrobianos inibindo o desenvolvimento de patógenos, em especial bactérias Gram-positivas. Villani et al. (1997) descreveram a atividade inibitória de substância antagonista produzidas por *S. xylosus* 1E contra *L. monocytogenes* em salames.

5.4.4. Atividade antagonista do sobrenadante livre de células

Os resultados demonstraram que o SLC proveniente do isolado *S. xylosus* LQ3 cultivado a 25 e 37 °C não conseguiu inibir o micro-organismo indicador, sugerindo que esse isolado não produz substâncias antagonistas como bacteriocina. Esse resultado já era esperado, visto que o isolado não apresentou atividade antagonista contra vários patógenos conforme resultados apresentados no item 6.4.3. Porém, é válido testar o SLC produzido por determinado micro-organismo em diferentes condições *in vitro*, conforme sugerido por vários autores. A composição química e o pH do meio, bem como a temperatura de crescimento podem afetar na produção de metabólitos de origem proteica (TODOROV, REENEN e DICKS, 2004). Schirru et al. (2014) verificaram que a produção de bacteriocina por linhagens de *Enterococcus faecium* foi influenciada pela temperatura e pH, sendo o ótimo de produção a 37 °C (51.200 UA/mL) e nos pHs 6 e 7 (25.600 UA/mL). Funck et al. (2015) verificaram que dois dos vinte e sete isolados foram capazes de produzir substâncias de origem proteica. Os autores avaliaram em seu estudo a influência do pH e da temperatura na produção de bacteriocina e perceberam que o pH e a temperatura exerceram influência na produção de bacteriocina pelo isolado 89. Porém, a produção de bacteriocina pelo isolado 99 não foi afetada pelas condições variadas *in vitro*.

5.4.5. Verificação de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas

Verificou-se que o isolado LQ3 não possui nenhum gene codificante para as enterotoxinas clássicas avaliadas. Em estudo realizado no Brasil, foram isolados 65 ECN a partir de queijo minas. O estudo demonstrou que dos 9 isolados identificados como *S. xylosus*, 2 apresentaram o gene *sea* (RALL et al., 2010). Já Martín et al. (2006), avaliaram a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* em isolados de ECN e verificaram que 3,3 % dos isolados, pertencentes as espécies *S. epidermidis*, *S. warneri* e *S. xylosus*, apresentaram o gene *sec*. Como se pode perceber vários pesquisadores têm identificado, mesmo que com baixa frequência, um ou mais genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas em ECN. Sendo assim, torna-se indispensável avaliar a presença desses genes em estafilococos que se destinam a aplicação em alimentos (RODRIGUEZ et al.,1996).

5.4.6. Detecção dos genes histidina e tirosina descarboxilase

O isolado LQ3 não apresentou os genes histidina descarboxilase (*hdc*) e tirosina descarboxilase (*tyrdc*). Esse é um resultado importante, já que as enzimas codificadas por esses genes são as responsáveis pela formação das aminas de origem bacteriana mais importantes em alimentos (BOVER-CID e HOLZAPFEL, 1999). Ruaro et al. (2013) também avaliaram 77 ECN isoladas de leite cru e queijo para genes de histidina e tiramina descarboxilase e encontraram o gene *tyrdc* em dois isolados, enquanto gene *hdc* não foi detectado. A literatura tem demonstrado que *S. xylosus* geralmente não possui a capacidade de descarboxila aminoácidos (GARDINI et al., 2002). Além disso, há estudos que comprovaram que algumas linhagens de *S. xylosus* podem degradar aminas biogênicas através da atividade amina oxidase (MARTUSCELLI et al., 2000).

6. Considerações Finais

O isolado *S. xylosus* LQ3 apresentou potencial tecnológico bem como segurança microbiológica e toxicológica. Em estudos futuros, pretende-se avaliar a capacidade do isolado em produzir enzima amina oxidase.

A perspectiva é de utilizar esse isolado na composição de culturas iniciadoras para verificar seu potencial tecnológico em um produto cárneo fermentado.

Referências

ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015.

American Public Health Association - APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4rd ed. Washington, DC, 2001

AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, n. 1, p. 138–146, maio 2007.

ARRIETA, M. P.; PRATS-MOYA, M. S. Free amino acids and biogenic amines in Alicante Monastrell wines. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1511–1519, 2012.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-acomparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 105–113, 2001.

BARON, F. et al. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of food protection**, v. 67, n. 10, p. 2302–2305, 2004.

BARRIÈRE, C. et al. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 2, p. 181–185, 2001.

BARROS, A. A. DE; BARROS, E. B. D. P. **A Química dos Alimentos: Produtos Fermentados e Corantes**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010

BERDAGUÉ, J. L. et al. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. **Meat Science**, v. 35, n. 3, p. 275–287, jan. 1993.

BERTSCH, D. et al. pDB2011, a 7.6kb multidrug resistance plasmid from *Listeria innocua* replicating in Gram-positive and Gram-negative hosts. **Plasmid**, v. 70, n. 2, p. 284–287, 2013.

BEYER, W. F.; FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 161, n. 2, p. 559–566, mar. 1987.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 4, p. 733–751, 1991.

BLAIOTTA, G. et al. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 271–284, 2004.

BOCKELMANN, W. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 123–131, jan. 2002.

BONOMO, M. G. et al. Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci from traditionally fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). **Meat Science**, v. 83, n. 1, p. 15–23, 2009.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 53, p. 33–41, 1999.

BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M. & VIDAL-CAROU, M. C. Effect of the interaction between a low tiramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic Staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, 65, 113-123, 2001

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos". D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 14 dedezembro de 1998.

BUCKENHÜSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 12, p. 253-272, 1993.

BUTT, H. L. et al. An association of membrane-damaging toxins from coagulase-negative staphylococci and chronic orofacial muscle pain. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 577–584, 1 jul. 1998.

CASABURI, A. et al. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. **Meat Science**, v. 76, n. 2, p. 295–307, 2007.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. et al. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin – Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**, v. 46, p. 222–226, 2015.

CHARPENTIER, M.; COURVALIN, P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p. 2103-2108, 1999.

CHEN, H.C. et al. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 13–18, jan. 2010.

CHENG, C. et al. Investigations of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 262–267, 2015.

ÇITAK, S.; VARLIK, Ö.; GÜNDOĞAN, N. Slime production and DNase activity of Staphylococci isolated from raw milk. **Journal of Food Safety**, v. 23, n. 4, p. 281–288, nov. 2003.

COTON, E.; COTON, M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 296–304, 2005.

CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. M100-S25, Wayne, PA, 2015.

CUNHA, M. DE L. R. DE S. D et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, mar. 2006.

DE MARTINIS, E. C. ; FRANCO, B. D. G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sakei* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 119–126, jun. 1998.

DONNELLY, J. et al. Superoxide dismutases in foods. A review. **Food Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 243–270, 1989.

DROSINOS, E. H. et al. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, n. 2, p. 307–317, fev. 2005.

DROSINOS, E. H. et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 260–270, 2007.

DUTRA, C. B. et al. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 111–120, 2007.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9, 10: 2393, 2011.

ESSID, I. et al. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**, v. 77, n. 2, p. 204–212, 2007.

ESSID, I.; HASSOUNA, M. Effect of inoculation of selected *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum* strains on biochemical, microbiological and textural characteristics of a Tunisian dry fermented sausage. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 707–714, 2013.

EVEN, S. et al. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 87–95, 2010.

FERREIRA, A. M. et al. Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S-23S interspace region molecular weight patterns. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 3, p. 406–411, 2012.

FIORENTINI, Â. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; ANGONESI BROD, F. C.; et al. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological potential for use in fermented sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 737–746, 2009a.

FIORENTINI, Â. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. Viability of *Staphylococcus xylosus* isolated from artisanal sausages for application as starter cultures in meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 129–133, mar. 2009b.

FLORES, M.; MARINA, M.; TOLDRÁ, F. Purification and characterization of a soluble methionyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. **Meat Science**, v. 56, n. 3, p. 247–254, nov. 2000.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S. W.; KANNER, J.; GERMAN, J. B. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. **J. Agric. Food Chem.** v.42, n.5, p.1054-1059. 1994.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 1–24, mar. 1999.

FRECH, G.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: Construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 4, p. 633–641, 2000.

FUNCK, G. D. et al. Efeito do pH e da temperatura na produção de bacteriocinas por bactérias ácido-láticas isoladas de presunto cozido. **Higiene Alimentar**, v. 29, p. 786–790, 2015.

GABRIEL, E. M. et al. Characterisation of clinical meticillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* demonstrating high levels of linezolid resistance (>256 µg/ml) resulting from transmissible and mutational mechanisms. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 7, p. 547–549, 2015.

GAGGIA, F. et al. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. S58–S66, nov. 2011.

GARCÍA-VARONA, M. et al. Characterisation of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 189–195, mar. 2000.

GARDINI, F. et al. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: Effect on the biogenic amine content. **Meat Science**, v. 61, p. 275–283, 2002.

GØTTERUP, J.; OLSEN, K.; KNÖCHEL, S.; TJENER, K.; STAHNKE, L. H.; MØLLER, J. K.S. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. **International Journal of Food Microbiology**, 120, 303-310, 2007

GRAPE, M.; SUNDSTRÖM, L.; KRONVALL, G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 1022–1024, 2003.

GÜNDOĞAN, N.; CITAK, S.; TURAN, E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. **Food Control**, v. 17, n. 5, p. 389–392, maio 2006.

HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 197–212, 2002.

HUSEBY, M. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8719–8726, 2007.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 302–310, 2008.

ISHIHARA, S. et al. Pathologic significance of *Staphylococcus saprophyticus* in complicated urinary tract infections. **Urology**, v. 57, n. 1, p. 17–20, 2001.

JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background , Virulence Factors , agr Groups (Alleles), and Human Disease. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.

JENSEN, L. B. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 31, n. 1, p. 60–158, 1999.

KEHRENBURG, C.; SCHWARZ, S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 2, p. 283–290, 2001.

KERRN, M. B. et al. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 513–516, 2002.

KIKUVI, G. M. et al. Streptomycin and Chloramphenicol Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Cattle, Pigs, and Chicken in Kenya. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, n. 1, p. 62–68, 2007.

KLOOS, W.E., SCHLEIFER, K.H. Genus IV. *Staphylococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1013 e 1035, 1986.

KOUKER, G.; JAEGER, K.-E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. **Appl Environ Microb**, v. 53, n. 1, p. 211–213, 1987.

LANDETA, G. et al. Screening of biogenic amine production by coagulase-negative staphylococci isolated during industrial Spanish dry-cured ham processes. **Meat Science**, v. 77, n. 4, p. 556–561, 2007.

LANDETA, G. et al. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 387–396, 2013.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics Molecular Research**, v.2, n.1, p. 63-76, 2003.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, n. 1-2, p. 1–37, 2000.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. DE. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 270–285, 2006.

LEROY, F.; VUYST, L. DE. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, fev. 2004.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 38–43, 2003.

LEUSCHNER, R. G.; HEIDEL, M.; HAMMES, W. P. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. **Int J Food Microbiol**, v. 39, n. 1-2, p. 1–10, 1998.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S122–S129, 2004.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S122–S129, 2004.

LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 86–91, 2007.

LOZANO, C. et al. Identification of novel *vga(A)*-carrying plasmids and a Tn5406-like transposon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* of human and animal origin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 4, p. 306–312, 2012.

MACHADO, A. B. M. P. **Resistência à metilina mediada pelo gene *mecA* nos *Staphylococcus* spp coagulase negativa**. 2007. 162 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MARQUES, V. F. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 161–170, fev. 2013.

MARTÍN, A. et al. Characterization of Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. **Meat Science**, v. 75, n. 4, p. 696–708, abr. 2007.

MARTÍN, B. et al. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 148–158, 2006.

MARTINEAU, F. et al. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant infected after cardiac surgery. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 527–533, 2000.

MARTUSCELLI, M. et al. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 228–32, 2000.

MATTHEWS, K. R. et al. Identification and Differentiation of Coagulase-Negative *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 686 – 8, 1997.

MAURIELLO, G. et al. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 149–158, 2004.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF:NEAD, 2010

MIRALLES, M. C.; FLORES, J.; PEREZ-MARTINEZ, G. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. **Food Microbiology**, v. 13, p. 227–236, 1996.

MOROT-BIZOT, S.; TALON, R.; LEROY-SETRIN, S. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 1, p. 279–286, 2003.

MOELLERING, R. C. Jr. Interaction between antimicrobial consumption and selection of resistant bacterial strains. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v 70, p. 18-24, 1990.

MUREDDU, A. et al. Identificazione molecolare di Stafilococchi coagulasi negativi isolati in Salsiccia Sarda stagionata. **Industrie Alimentari**, v. 539, n. August 2015, p. 17–23, 2013.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, n. 1, p. 13–126, jan. 1999.

ORDÓÑEZ, J, A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G, D, G, F.; PERALEZ, L, H.; CONTECERO, M, D, S. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, vol 2, 2005.

PANG, Y.; BOSCH, T.; ROBERTS, M. C. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 5, p. 417–422, out. 1994.

PINTO, M.F.; PONSANO, E.H.G.; HEINEMANN, R.J.B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos - Uma revisão. Bol. SBCTA. v. 35(1/2), p. 109-116, jan.-dez., 2001.

RALL, V. L. M. et al. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne pathogens and disease**, v. 7, n. 9, p. 1121–1123, 2010.

RESCH, M.; NAGEL, V.; HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 99–104, 2008.

RODRIGUEZ M., NUÑEZ F., CORDOBA, J. J., BERMÚDEZ, E.; ASENSIO, M. A. Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v.626, p.1897–1902, 1996.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1-2, p. 61–70, 2002.

RUARO, A. et al. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 106–111, 2013.

SAMELIS, J. et al. Stability and safety of traditional Greek salami - a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 1-2, p. 69–82, 20 out. 1998.

SANTOS M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. **Food Microbiology** 29, p.213-23,1996.

SCHIRRU, S. et al. Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 321–331, 21 mar. 2014.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675–690, out. 1996.

SIMONOVÁ, M. et al. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**, v. 73, n. 4, p. 559–564, 2006.

SOARES, J. C. et al. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 123–129, 2011.

SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, J. C; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food & Technology**, v.13, p.60-67, 2002.

STAHNKE, L.H. Aroma Components from Dried Sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. **Meat Science**, v.38, p.39-53, 1994.

- STROMMENDER, B. et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4089–94, 2003.
- SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 41–54, 15 nov. 2003.
- TALON, R. et al. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, n. 1-2, p. 47–56, 1999.
- TALON, R.; LEROY, S.; LEBERT, I. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. **Meat Science**, v. 77, n. 1 SPEC. ISS., p. 55–62, 2007.
- TALON, R.; LEROY, S. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentation. **Meat Science**. 89, 303–309, 2011.
- TERRA, A. B. de M., FRIES. L. L. M., TERRA, N. N., **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Livraria Varela, 2004
- TODOROV, S. D.; REENEN, C. A. VAN; DICKS, L. M. T. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 149–157, 2004.
- TRABULSI, L. R. ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 5º ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- VALSECHI, O. A. **Noções básicas de tecnologia de carne**. São Paulo, 2001. <Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/carne.pdf>> acesso em 28 de janeiro de 2016.
- VIDAL-CAROU, M. C., VENCIANA-NOGUÉZ, T., LATORRE-MORATALLA, M. L. & BOVER-CID, S. Biogenic Amines: risks and control. In: F. Todrá (ed.), Handbook of fermented meat and poultry. Ames, IA: *Blackwell Publishing Professional*. 455-468, 2007.
- VILLANI, F.; SANNINO, L.; MOSCHETTI, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; AMODIO-COCCHIERI, R.; COPPOLA, S. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. **Food Microbiology**, 14, 555–566, 1997.
- VILLEN, R. A. **Biotecnologia - Histórico e Tendências**. Disponível em: <<http://hottopos.com/regeq10/rafael.htm>>. Acesso em: 29 nov. 2015.

WERTHEIM, H. F. L. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.

ZANARDI, E., GHIDINI, S., BATTAGLIA, A., CHIZZOLINI, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. **Meat Science**. 66, 415-423, 2004.

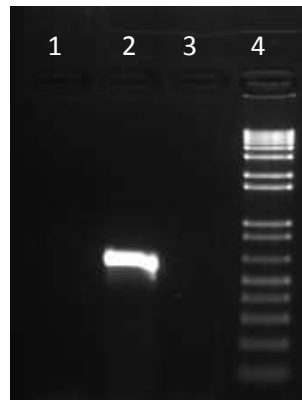
ZELL, C. et al. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 246–251, 2008.

ZIMMERMANN, R.; FLOHE, L.; WESER, U.; HARTMANN, H.J. Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase, **FEBS Lett.** 29,117–120,1973.

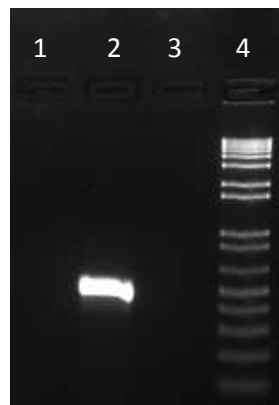
ZOCHE, F. et al. Multiplex PCR for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin in south of Rio Grande do Sul, Brasil. **Asoc. Interciencia**, v. 34, p. 487–491, 2009.

APÊNDICES

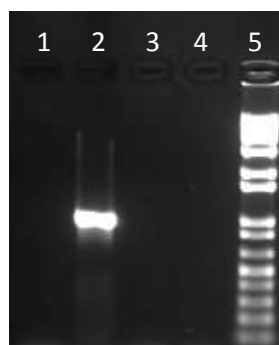
APÊNDICE A - Fotos de géis de agarose referente aos produtos de PCR de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos.



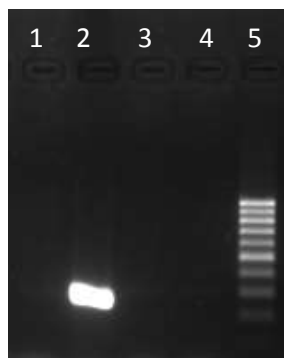
Produtos da amplificação do gene *strA* (645 pb). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolado de queijos. Canaletas 2: *Salmonella* Typhimurium 22 C. Canaletas 3: *Escherichia coli* ATCC 25922. Canaletas 4: marcador de peso molecular 1Kb.



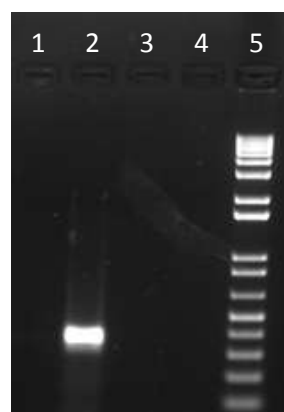
Produtos da amplificação do gene *strB* (510 pb). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolado de queijos. Canaletas 2: *Salmonella* Typhimurium 140B1. Canaletas 3: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Canaletas 4: marcador de peso molecular 1Kb.



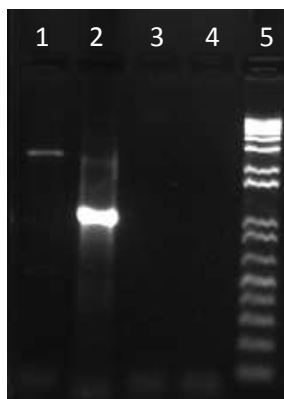
Produtos da amplificação do gene *sul 1* (840 pb). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaletas 2: *Salmonella* Typhimurium 22C. Canaletas 3: *Escherichia coli* 25922. Canaletas 4: água. Canaletas 5: marcador de peso molecular 1Kb.



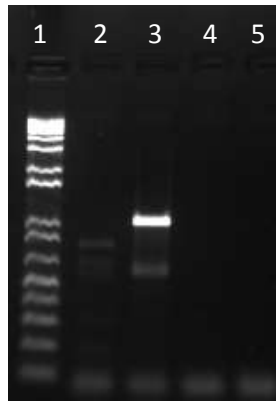
Produtos da amplificação do gene *sul 2* (293 *pb*). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaletas 2: *Salmonella* Typhimurium 171B2. Canaletas 3: *Escherichia coli* 25922. Canaletas 4: água. Canaletas 5: marcador de peso molecular 1Kb.



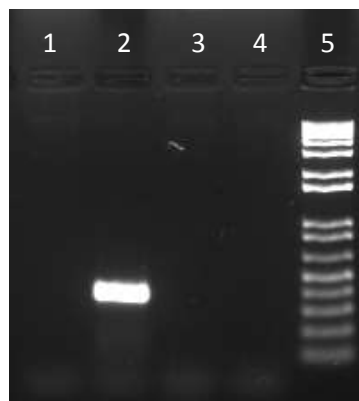
Produtos da amplificação do gene *ermC* (299 *pb*). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaletas 2: *Staphylococcus aureus* S10. Canaletas 3: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Canaletas 4: água. Canaletas 5: marcador de peso molecular 1Kb.



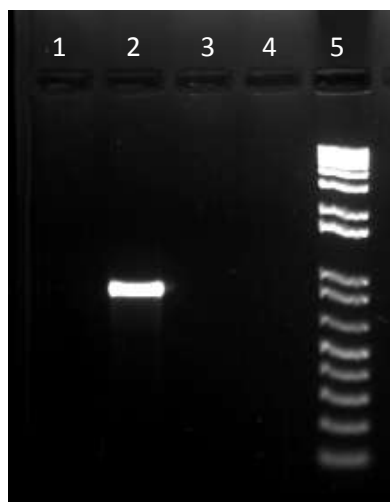
Produtos da amplificação do gene *tetB* (1.169 *pb*). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaletas 2: *Salmonella* Typhimurium 171B2 Canaletas 3: *Staphylococcus aureus* 25923. Canaletas 4: água. Canaletas 5: marcador de peso molecular 1Kb.



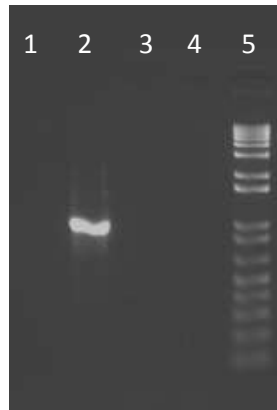
Produtos da amplificação do gene *tetA* (953 *pb*). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb
Canaleta 2: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaleta 3: *Salmonella* Typhimurium 22C.
Canaleta 4: *Staphylococcus aureus* 25923. Canaleta 5: água..



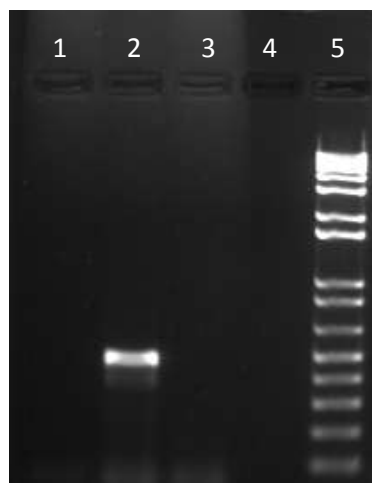
Produtos da amplificação do gene *tetK* (360 *pb*). Canaleta 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo.
Canaleta 2: *Staphylococcus aureus* S2. Canaleta 3: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.
Canaleta 4: água. Canaleta 5: marcador de peso molecular 1Kb



Produtos da amplificação do gene *tetO* (781 *pb*) Canaleta 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo.
Canaleta 2: *Campylobacter* termófilo 119. Canaleta 3: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.
Canaleta 4: água. Canaleta 5: marcador de peso molecular 1Kb.



Produto da amplificação de gene *Tn1545* (1.028 pb). Canaleta 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaleta 2: *Staphylococcus aureus* S10. Canaleta 3: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Canaleta 4: água. Canaleta 5: marcador de peso molecular 1Kb.



Produto da amplificação do gene *ermB* (424 pb). Canaleta 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaleta 2: *Staphylococcus aureus* 218. Canaleta 3: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Canaleta 4: água. Canaleta 5: marcador de peso molecular 1Kb.



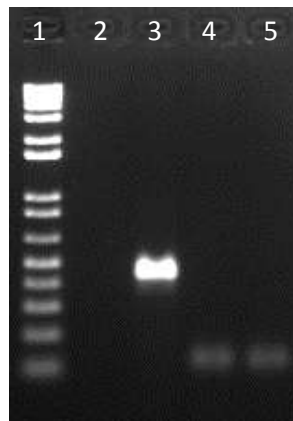
Produto da amplificação do gene *tetL* (1.028 pb). Canaleta 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaleta 2: *Staphylococcus aureus* S2. Canaleta 3: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Canaleta 4: água. Canaleta 5: marcador de peso molecular 1Kb.



Produto da amplificação do gene *tetM* (158 pb). Canaleta 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaleta 2: *Staphylococcus aureus* S10. Canaleta 3: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Canaleta 4: água. Canaleta 5: marcador de peso molecular 1Kb.

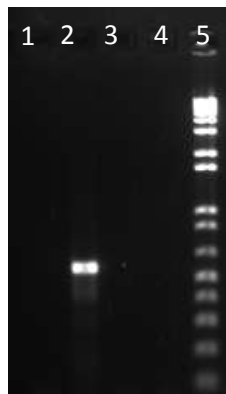


Produto da amplificação do gene *blaZ* (172 pb). Canaleta 1: *S. xylosus* LQ3 isolado de queijo. Canaleta 2: *Staphylococcus aureus* S10. Canaleta 3: *Escherichia coli* NCTC 12900; Canaleta 4: água. Canaleta 5: marcador de peso molecular 1 kb

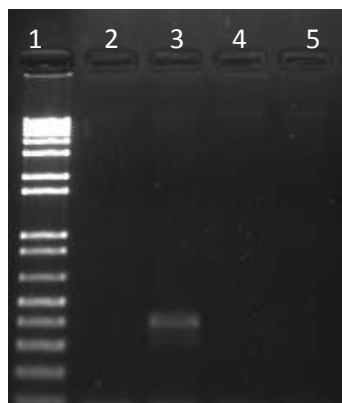


Produto da amplificação do gene *dfrG* (422 pb). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1 kb. Canaleta 2: *S. xylosus* LQ3 isolado de queijo. Canaleta 3: *Staphylococcus aureus* S10. Canaleta 4: *Escherichia coli* NCTC 12900. Canaleta 5: água.

Apêndice B – Fotos de géis de agarose referente aos produtos de PCR dos genes codificantes para enterotoxinas estafilocócicas.



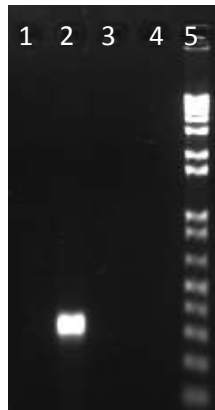
Produtos da amplificação do gene *eea* (544 *pb*). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaletas 2: *S. aureus* FRI S6. Canaletas 3: *S. xylosus* ATCC 29971. Canaletas 4: água. Canaletas 5: marcador de peso molecular 1Kb.



Produtos da amplificação do gene *eeb* (404 *pb*). Canaletas 1: marcador de peso molecular 1Kb. Canaletas 2: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaletas 3: *S. aureus* FRI S17. Canaletas 4: *S. xylosus* ATCC 29971. Canaletas 5: água.



Produtos da amplificação do gene *eec* (257 *pb*). Canaletas 1: marcador de peso molecular 1Kb. Canaletas 2: *S. xylosus* LQ3 isolado de queijo. Canaletas 3: *S. aureus* ATCC 19095. Canaletas 4: *S. xylosus* ATCC 29971. Canaletas 5: água

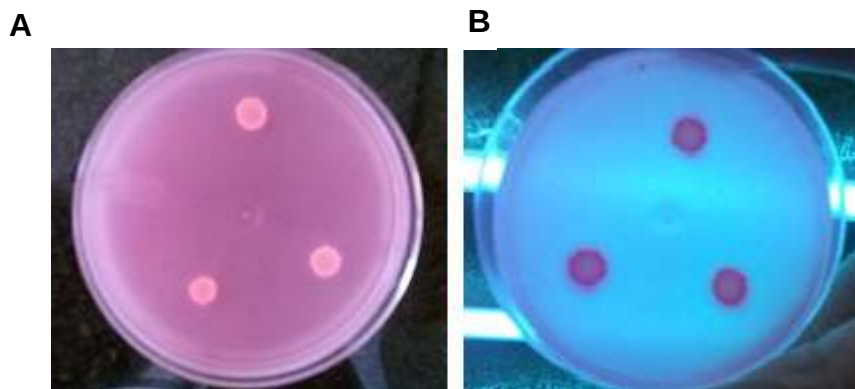


Produtos da amplificação do gene *eed* (330 *pb*). Canaletas 1: *S. xylosus* LQ3 isolados de queijo. Canaletas 2: *S. aureus* FRI 361. Canaletas 3: *S. xylosus* ATCC 29971. Canaletas 4: água. Canaletas 5: marcador de peso molecular 1Kb.

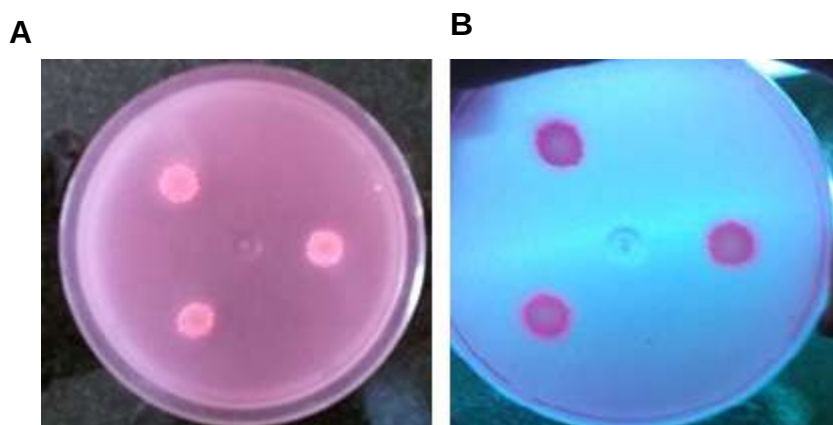


Produtos da amplificação do gene *eee* (482 *pb*). Canaletas 1: marcador de peso molecular 1Kb. Canaletas 2: *S. xylosus* LQ3 isolado de queijo. Canaletas 3: *S. aureus* FRI 326. Canaletas 4: *S. xylosus* ATCC 29971. Canaletas 5: água

APÊNDICE C – Atividade lipolítica

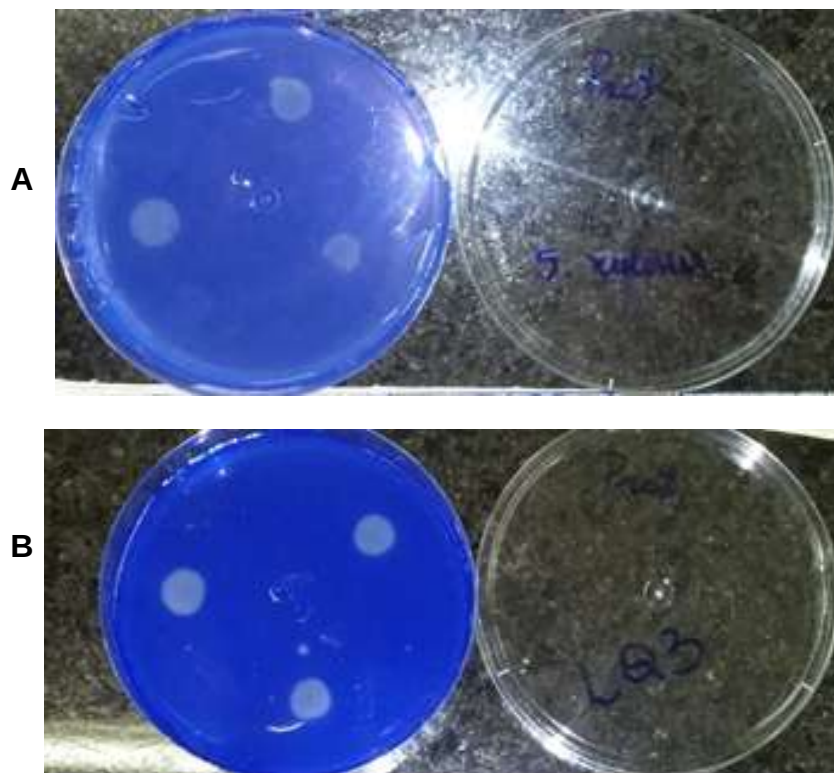


Atividade lipolítica de *S. xylosus* ATCC 29971 (controle positivo) sem incidência de luz UV (A) e com incidência de luz UV a 350 nm com aparecimento de halo fluorescente (B).



Atividade lipolítica de *S. xylosus* LQ3 sem incidência de luz UV (A) e com incidência de luz UV a 350 nm com aparecimento de halo fluorescente (B).

APÊNDICE D – Atividade proteolítica



Atividade proteolítica em ágar BSA. (A) *S. xylosus* ATCC 29971 (controle positivo) com aparecimento de halos translúcidos e (B) *S. xylosus* LQ3 com aparecimento de halos translúcidos

APÊNDICE E – Atividade nitrato redutase



Atividade nitrato redutase. Canto superior esquerdo *S. xylosus* ATCC 29971 (controle positivo), canto superior direito *S. xylosus* LQ3, canto inferior direito *L. plantarum* ATCC 8014 (controle negativo) e canto inferior esquerdo H_2O (controle negativo).

APÊNDICE F – Atividade hemolítica e DNase

A



B



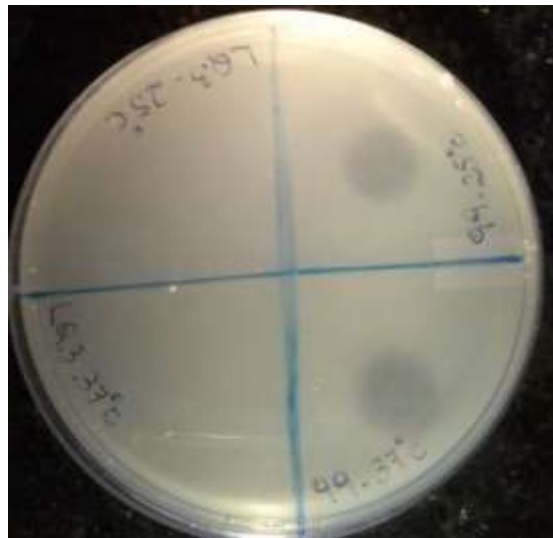
Atividade hemolítica em ágar TSA suplementado com sangue equino. Atividade positiva para *L. monocytogenes* ScottA (controle positivo) e atividade negativa para *S. xylosus* LQ3 (A). Atividade DNase em ágar DNA azul de Toluidina. Atividade positiva para *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo) e atividade negativa para *S. xylosus* LQ3 (B).

APÊNDICE G – Antagonismo de *S. xylosus* LQ3 contra bactérias patogênicas

Micro-organismos	<i>S. xylosus</i> LQ3	<i>L. plantarum</i> ATCC8014
	Halos em milímetros	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	12
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-	10
<i>Listeria monocytogenes</i> Siliken	-	10
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	-	14
<i>Listeria innocua</i> CLIP 12612	-	11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	-	9
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	-	9

- sem atividade

APÊNDICE H – Atividade do sobrenadante livre de células



Atividade do sobrenadante livre de células. Canto superior direito e canto inferior direito, atividade positiva para o isolado *Lactobacillus curvatus* P99 cultivado a 25 e 37 °C (controle positivo) e, canto superior esquerdo e canto inferior esquerdo, atividade negativa para *S. xylosus* LQ3 cultivado a 25 e 37 °C.